

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-356437

(43)Date of publication of application : 13.12.2002

(51)Int.Cl. A61K 38/00
A01K 67/027
A61K 31/711
A61K 45/00
A61K 48/00
A61P 19/00
A61P 19/02
A61P 19/08
A61P 19/10
A61P 43/00
C12N 5/06
C12N 15/09
C12Q 1/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566
// C07K 14/47

(21)Application number : 2001-235851

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 03.08.2001

(72)Inventor : HIKICHI YUICHI

(30)Priority

Priority number : 2000242767 Priority date : 04.08.2000 Priority country : JP

(54) USE OF GLI1 GENE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a use of Gli1 gene.

SOLUTION: A screening method using a cell capable of expressing Gli1 gene can be used for the search of a compound or its salt having an activity to control the expression of Gli1 gene. A compound having an activity to promote the expression of Gli1 gene has a bone or cartilage inducing activity and, accordingly, it can be used as an agent for preventing and treating diseases of orthopedic field, diseases of dental surgery field and osteoporosis, etc. It is further usable as a treating agent for bone grafting in cosmetic surgery field and a differentiation inducing agent for autotransplantation in regeneration medicine. A compound active to inhibit the expression of Gli1 gene can be used e.g. as a preventing and treating agent for hyperosteogenesis or hyperchondrogenesis.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-356437

(P2002-356437A)

(43) 公開日 平成14年12月13日 (2002.12.13)

(51) Int. Cl.	識別記号	P I	キーワード (参考)
A 6 1 K 38/00		A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		45/00	4 B 0 5 3
45/00		48/00	4 B 0 5 5
48/00		A 6 1 P 19/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数51 O L (全 68 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-235851 (P2001-235851)

(22) 出願日 平成12年8月3日 (2001.8.3)

(31) 優先権主張番号 特願2000-242767 (P2000-242767)

(32) 優先日 平成12年8月4日 (2000.8.4)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002034

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 引地 裕一

茨城県つくば市松代4丁目21番2 シャレ

ールつくば松代1号棟504号

(74) 代理人 100003676

弁理士 小林 純子 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I I I 遺伝子の用途

(57) 【要約】

【課題】 G I I I 遺伝子の用途の提供。

【効果】 本発明の G I I I 遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたスクリーニング方法は、G I I I 遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩の探索に用いることができる。G I I I 遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物は骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域の疾患、または歯科領域の疾患、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G I I I 遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物は、例えば骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤として用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤。

【請求項2】 G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である請求項1記載の剤。

【請求項3】 G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である請求項1記載の剤。

【請求項4】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項5】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨・軟骨分化誘導剤。

【請求項6】 DNAが配列番号：9、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16または配列番号：18で表される塩基配列を含有する請求項5記載の剤。

【請求項7】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組換えベクターを含有する請求項5記載の剤。

【請求項8】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項9】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項10】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項11】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用。

【請求項12】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用。

【請求項13】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項14】 G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項15】 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用。

【請求項16】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用。

【請求項17】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨分化阻害剤。

【請求項18】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤。

【請求項19】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨疾患の診断剤。

【請求項20】 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法。

【請求項21】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を含有する骨・軟骨疾患の診断剤。

【請求項22】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法。

【請求項23】 G111タンパク質、その部分ペプチ

ドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項24】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項25】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項26】 軟骨分化のマーカー遺伝子がI型Bコラーゲン遺伝子である請求項25記載のスクリーニング方法。

【請求項27】 G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態を観察することを特徴とする請求項23記載のスクリーニング方法。

【請求項28】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項29】 請求項23～27記載のスクリーニング方法、または請求項28記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩。

【請求項30】 請求項29記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨分化調節剤。

【請求項31】 請求項29記載の化合物またはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤。

【請求項32】 請求項29記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法。

【請求項33】 請求項29記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療方法。

【請求項34】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項35】 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための請求項29記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項36】 G111タンパク質、その部分ペプチ

ドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項37】 G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【請求項38】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項39】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのG111タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする請求項38記載のスクリーニング方法。

【請求項40】 G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項41】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞である請求項38記載のスクリーニング方法。

【請求項42】 G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項43】 G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項44】 請求項38記載のスクリーニング方法、または請求項42記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩（但し、G113遺伝子またはその産物を除く）。

【請求項45】 請求項40記載のスクリーニング方法、または請求項43記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩。

【請求項46】 請求項44または45記載の化合物またはその塩を含有する医薬。

【請求項47】 請求項44または45記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤。

【請求項48】 請求項44または45記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法。

【請求項49】 骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための請求項44または45記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項50】 G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法。

【請求項51】 G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はG111遺伝子が発現する能力を有する細胞を用いたG111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング方法を用いて得られうる化合物またはその塩、および該化合物の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】グリア芽腫遺伝子（G111、G112およびG113）のうち、G111遺伝子の産物であるG111タンパク質はzinc fingerを有する転写因子に属し、ショウジョウバエの転写因子C1（Cubitus interruptus）の脊椎動物におけるホモログとされている（Aza-Blanc, P. et al., Trends Genet. (1999) 15, 458-462）。ショウジョウバエC1の機能については研究が進んでおり、C1が誘導する分子などが報告されている（McMahon, A.P. et al., Cell (2000) 100, 185-188）。G111タンパク質については、3種のG111タンパク質すべてがzinc finger領域を介して共通な配列に結合すること、G113タンパク質が直接G111遺伝子に含まれるプロモーター領域に結合し、その転写を誘導していることなどが報告されているが、G111タンパク質の機能はショウジョウバエのC1タンパク質の機能からの推定が主となっており、誘導分子などについても未知の点が多い。一方、G111遺伝子発現はヘッジホッグ（hedgehog）と呼ばれる可溶性分泌タンパク質によるシグナル伝達によって誘導されるとされている

（Dai, P. et al., J. Biol. Chem. (1999) 274, 8143-8152）。ヘッジホッグファミリーは昆虫から脊椎動物までを含む多くの動物種における形態形成の鍵として注目されている一群のタンパク因子であり、例えばSonic hedgehogの活性部位であるN末端ドメインを過剰発現させた繊維芽細胞をスーダマウスに移植すると異所性骨形成が誘導されることが報告されている（Kintz, R. et al., PNAS Int. (1997) 404, 319-323）。これらの点で

ヘッジホッグタンパク質は様々な骨・軟骨障害、骨・軟骨疾患の治療、予防に有効と考えられるが、天然には微量にしか存在せず、治療に使用するべく大量に入手するためには組み換え型タンパク質を生産する必要がある。一般的に組み換え型タンパク質の生産は低分子化合物の生産よりはるかに多くの費用を要し、またタンパク質という特性から、医薬品としての物性、投与方法にも制約がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】骨・軟骨組織は未分化間葉系細胞等の多分化能を有する細胞の骨・軟骨前駆細胞への分化決定の後、骨・軟骨細胞への分化、増殖、骨・軟骨基質の合成といった一連の過程を経て形成される。胎生期や骨折治癒などの骨形成過程においては一般に軟骨分化が骨形成に先立って起こることから、軟骨分化促進は骨分化促進にもつながる。障害を受けた骨・軟骨組織の修復や誘導を要する疾患、あるいは過形成が問題となっている疾患はこれらのいずれかの過程が破綻していると考えられるが、これらを治癒に向わせる安価で、効果的な優れた医薬品の創製が切望されていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討した結果、G111の機能解析研究においてG111を強制発現させると、軟骨マーカーの発現が亢進することを見出し、さらには例えばScleraxisなどのヘッジホッグシグナルに関与するとの報告がない転写因子の遺伝子を強制発現させることによってもG111誘導は可能であることなどからヘッジホッグタンパク質を用いなくともG111発現の制御が可能であることを見出した。さらにヘッジホッグレセプターに直接作用するものではない一部の既存低分子化合物がG111の発現を誘導し、ひいては軟骨マーカー遺伝子の発現をも誘導することを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は

（1）G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨・軟骨分化誘導剤、（2）G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である前記（1）記載の剤、（3）G111タンパク質が配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再生剤または骨移植治療

剤、(5) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨・軟骨分化誘導剤、

(6) DNAが配列番号：9、配列番号：12、配列番号：14、配列番号：16または配列番号：18で表される塩基配列を含有する前記(5)記載の剤、(7) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する組織欠陥部を含有する前記(5)記載の剤、(8) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤、(9) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することと特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(10) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の有効量を哺乳動物に投与することと特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(11) 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用、(12) 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の使用、(13) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することと特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(14) G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの有効量を哺乳動物に投与することと特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(15) 骨・軟骨分化誘導剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用、(16) 骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するためのG111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの使用、(17) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨分化阻害剤、(18) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDN

A、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、(19) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを含有する骨・軟骨疾患の診断剤、(20) 配列番号：10、配列番号：11、配列番号：13、配列番号：15または配列番号：17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA、または該DNAの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列を含有するアンチセンスDNAを用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法、(21) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を含有する骨・軟骨疾患の診断剤、(22) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いることを特徴とする骨・軟骨疾患の診断方法、(23) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(24) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(25) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することを特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(26) 軟骨分化のマーカー遺伝子がI型Bコラーゲン遺伝子である前記(25)記載のスクリーニング方法、(27) G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態を観察することと特徴とする前記(23)記載のスクリーニング方法、(28) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(29) 前記(23)～(27)記載のスクリーニング方法、または前記(28)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、骨・軟骨分化調節作用を有する化合物またはその塩、(30) 前記(29)記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨分化調節剤、(31) 前記(29)記載の化合物またはその塩を含有する骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤、(32) 前記(29)記載

の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法、(33)前記(29)記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療方法、(34)骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための前記(29)記載の化合物またはその塩の使用、(35)骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症、骨粗鬆症または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤、骨・軟骨欠損部の再生治療剤、骨再建剤または骨移植治療剤を製造するための前記(29)記載の化合物またはその塩の使用、(36)G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(37)G111タンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の作用を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法、(38)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いることを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(39)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれのG111タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする前記(38)記載のスクリーニング方法、(40)G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(41)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞が骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞である前記(38)記載のスクリーニング方法、(42)G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(43)G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を含有することを特徴とするG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(44)前記(38)記載のスクリーニング方法、または前記(42)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩(但し、配列番

号:20または配列番号:22で表されるG113遺伝子またはその産物(配列番号:19または配列番号:21)を除く)、(45)前記(40)記載のスクリーニング方法、または前記(43)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩、(46)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩を含有する医薬、(47)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩を含有する骨・軟骨疾患の予防・治療剤、(48)前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする骨・軟骨疾患の予防・治療方法、(49)骨・軟骨疾患の予防・治療剤を製造するための前記(44)または(45)記載の化合物またはその塩の使用、(50)G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨・軟骨分化誘導方法、(51)G111遺伝子の発現を増強または活性化することを特徴とする骨折、変形性関節症、骨関節炎、軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症または骨粗鬆症の予防・治療方法などを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明においてG111遺伝子とはSasaki et al. Development (1999) 129, 3915-3924、Kinzler, KW. et al., Science (1987) 236, 70-73などに記載されている公知の遺伝子であり、マウスの遺伝子はAF026305、AB025922、ヒトの遺伝子はX07384としてGenBankに各々対応するアミノ酸配列とともに登録されている。また、G111遺伝子の多型についての研究がなされ、配列番号:14、16および18(対応するアミノ酸配列はそれぞれ配列番号:13、15および17)で表される、ヒトG111遺伝子上に3箇所の塩基置換が存在していることが報告されている(J. Invest. Dermatol. (2000) 115, 328-329)。本発明において「G111タンパク質」としては、配列番号:10、11、13、15または17で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質を挙げることができる。G111タンパク質は、例えば、温血動物(例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等)のあらゆる細胞(例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、肝臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、筋芽細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)や血球系の細胞、

またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織。例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、脳頭核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。なかでも温血動物（例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）などに由来するタンパク質が好ましく用いられる。

【0007】配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。本発明の配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用などが挙げられる。実質的に同質とは、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用が性質的に同質であることを示す。したがって、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。骨・軟骨分化誘導作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定することができる。転写活性の測定は公知の方法、例えばレポーターアッセイやRT-PCRなどの方法を用いて行うことができる。

【0008】また、本発明で用いられるG111タンパク質としては、①配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1

～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども用いられる。

【0009】本明細書におけるG111タンパク質は、ペプチド表記の慣例に従って、左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のG111タンパク質は、C末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁、アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅、シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₁₀、アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁、アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁、アルキル基などのC₁、アラールキル基のほか、経口用エステルとして用いられるジバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明におけるG111タンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明におけるG111タンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明におけるG111タンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂、アルカノイル基などのC₁、アシル基など）で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどのC₂、アルカノイル基などのC₁、アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明におけるG111タンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：

10、11、13、15または17で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質などが用いられる。

【0010】本発明におけるG111タンパク質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記したG111タンパク質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよい。本発明における部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記したG111タンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を含有するペプチドなどが好ましい。実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、より好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、なかでも好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行うことができる。

【0011】また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1〜5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1〜20個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個（1〜5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1〜10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1〜5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のG111タンパク質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明のG111タンパク質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0012】本発明におけるG111タンパク質またはその塩は、上記した哺乳動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできる

し、後に記載する本発明のG111タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製分離することができる。

【0013】本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-（2', 4'-ジメトキシフェニル）ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、4-（2', 4'-ジメトキシフェニル）Fmocアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOBT）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するか、または、対酢酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0014】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいは

これらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 -20°C ～ 50°C の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化する

【0015】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、C1-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フクロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェニルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、C1-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホン、DNP、ベンジルオキシメチル、Bom、Boc、Tri、Fmocなどが用いられる。

【0016】原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル（アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,6-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N

-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステルなどが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリブトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0017】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシ基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

【0018】本発明におけるG1；1タンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明におけるG1；1タンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造すること

ができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher 10 s, New York (1966年)

②Schroeder および Luecke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および 榎原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、経路薬品の開発 第4巻 ペプチド合成 応用書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0019】本発明におけるG111タンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明におけるG111タンパク質をコードする塩基配列 (DNA またはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明におけるG111タンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。本発明におけるG111タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997 記載の公知の方法またはそれに準じた方法により、G111タンパク質のmRNAを定量することができる。G111タンパク質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまた

はmRNA兩分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase ChainReaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。具体的には、G111タンパク質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号: 9、13、14、16または18で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のG111タンパク質と実質的に同質の活性 (例、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用など) を有するG111タンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号: 9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0020】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。より具体的には、配列番号: 10で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 9で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 11で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 12で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 13で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 14で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 15で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 16で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号: 17で表わされるアミノ酸配列を含有するG111タンパク質をコードするDNAとしては、配列番号: 18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。本発明におけるG111タンパク質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な

塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。本発明に従えば、G111タンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたG111タンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G111タンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいはG111タンパク質関連RNAとの相互作用を介してG111タンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G111タンパク質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、およびG111タンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外でG111タンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。G111タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リビート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端ポリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G111タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0021】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係、即ち対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということが出来る。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さ

らに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類似物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α -アノマー型の核酸など）であつてもよい。ここで「ヌクレオチド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0022】本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオチドアミドやオリゴヌクレオチドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., *Pharm Tech Japan*, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., *Antisense Research and Application*, CRC Press, 1993などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロソームのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療

により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内スクレオンド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAaseなどのスクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、デトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンス核酸の阻害活性は、G111遺伝子またはG111遺伝子を含む細胞ベクターを含む形質転換体、生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG111タンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0023】本発明における部分ペプチドをコードするDNAとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含むものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA断片を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：

9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含むDNAの部分塩基配列を含むDNA、または（2）配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含むDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む、本発明のG111タンパク質と実質的に同質の活性（例、転写活性や骨・軟骨分化誘導作用など）を有するG111タンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含むDNAなどが用いられる。より具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、（1）配列番号：9、12、14、16または1

8で表わされる塩基配列を含むDNAの部分塩基配列を含むDNA、または（2）配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含むDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含む、本発明におけるG111タンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの部分塩基配列を含むDNAなどが用いられる。配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含むDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。また、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列を含むDNAとハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：9、12、14、16または18で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含むDNAなどが用いられる。

【0024】本発明におけるG111タンパク質またはその部分ペプチド（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を含む合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0025】DNAの塩基配列の置換は、PCRや公知のキット、例えば、MutanTM-superExpress Km（宝酒造）、MutanTM-K（宝酒造）等を用いて、OlaTM-LA PCR法、gapped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローニングされた本発明のタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有しているもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、

(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAを含む、例えばcDNAから目的とするDNA断片を切り出し、
(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0026】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pCR4、pCR2.1、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP₁プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

【0027】発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子(メソトレキセート(MTX)耐性)、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、CHO(dhfr⁻)細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する

場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN末端側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母で

ある場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インテグリン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

【0028】宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103[スクイレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101[ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600[ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)], DH5α[Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H., Gene, 96, 23-28(1990)], DH10B[プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 87巻, 4645-4649(1990)]などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチリス(Bacillus subtilis) M1114[ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21[ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シンサッカロマイセス・ボンベ(Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036, ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などが用いられる。

【0029】昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞(Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの脚由来のHigh FiveTM細胞、Mamestrabraciccae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞(Bombyx mori; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫とし

ては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr⁻)細胞と略記)、マウスL細胞、マウスA1T-20、マウスミエロマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

【0030】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッド・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、G11タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸三元素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0031】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地

〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experimental Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3-β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行い、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Barkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Hitte, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0032】宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, I. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 783(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・メサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0033】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことがで

きる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100[®]などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせで行うことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や透析法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0034】このようにして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。このようにして生成する本発明のG111タンパク質またはその塩の特性は、例えばG111結合配列を持つ二本鎖DNAへの結合能等を指標に測定することができる。

【0035】本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明におけるG111タンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質等を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0036】〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2〜6週毎に1回ずつ、計2〜10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2〜5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256巻、495頁（1975年））に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1〜20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000〜PEG6000）が10〜80%程度の濃度で添加され、約20〜40℃、好ましくは約30〜37℃で約1〜10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0037】モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地

を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定で

【0038】(b)モノクローナル抗体の精製
モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行うことができる。

【0039】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質等の抗原）とキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率的くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンバット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1~20、好ましくは約1~5の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の結合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。結合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2~6週毎に1回ずつ、計約3~10回程度行うことができる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗

体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0040】(1) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤として有用である。

(2) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAおよびG111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物等のスクリーニングに用いることができる。

(3) G111遺伝子のアンチセンスDNA等は、所謂遺伝子治療剤（骨・軟骨分化阻害剤または骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤）として、または遺伝子診断剤（骨・軟骨疾患の診断剤）などとして有用である。

(4) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体は骨・軟骨疾患の診断剤として有用である。

G111タンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、G111タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、G111タンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、G111遺伝子のアンチセンスDNAの用途等について、以下に具体的に説明する。

【0041】(1) 骨・軟骨分化誘導剤

① G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または該タンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAは骨・軟骨分化誘導剤などの医薬として使用することができる。例えば、生体内においてG111タンパク質またはヘッジホッグが減少しているために、またはヘッジホッグによるシグナルが有効に伝達されないためにG111遺伝子またはその産物による生理作用（転写活性、骨・軟骨分化誘導作用など）が期待できない（該G111タンパク質の欠乏症）患者がいる場合に、① G111タンパク質等を該患者に投与し該タンパク質の量を補充したり、② (イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAあるいは該DNAを含有する組換えベクターを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ) 対象となる細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞等）に本発明のタンパク質をコードするDNAを

挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるG111タンパク質の量を増加させ、転写活性、骨・軟骨分化誘導作用を充分に発揮させることができる。すなわち、本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAは、安全で低毒性な骨・軟骨分化誘導剤として有用である。本発明のタンパク質または該タンパク質をコードするDNAは骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊椎管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。本発明のタンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。一方、本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。例えば、①本発明のタンパク質または②該タンパク質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のタンパク質または②該タンパク質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【0042】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態

がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0043】また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。本発明のタンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、軟骨損傷患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01~30mg程度、好

ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0044】(2) ①G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物、②G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物または③骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニング方法

上記したごとく、G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAおよびG111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物やG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物等のスクリーニングに用いることができ、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞としては、温血動物（例えば、ヒト、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）の細胞（例えば、グリア細胞、骨髄細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨細胞もしくは骨芽細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞等）が用いられる。特に、骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞が好ましく、軟骨細胞、繊維芽細胞（例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2）、筋芽細胞（例、マウス筋芽細胞株C2C12）などがより好ましい。

【0045】以下に、本発明のG111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法について詳述する。G111遺伝子発現はヘッジホッグと呼ばれる可溶性タンパク質によるシグナル伝達によって誘導され、骨形成を誘導し、骨・軟骨分化促進活性を有するため、G111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物またはその塩は、骨・軟骨分化調節（特に促進）作用を有し、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、G111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物またはその塩は、骨・軟骨分化調節（特に阻害）作用を有し、例えば骨・軟骨形成過剰症などの治療

・予防剤などの医薬として使用できる。したがって、G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAまたはG111遺伝子を発現する能力を有する細胞は、G111遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物のスクリーニングのための材料として用いることができる。

【0046】すなわち、本発明は、①G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養し、G111遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてG111タンパク質をコードするmRNA（以下、G111mRNAと略称する場合がある。）の量を測定することを特徴とするG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、より具体的には、②(i) G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を培養した場合のG111mRNAの発現量と、(ii) G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下に培養した場合のG111mRNAの量との比較を行うことを特徴とする、G111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞としては、例えば、前記したG111遺伝子を発現する能力を有する公知の温血動物細胞などがあげられる。G111遺伝子を発現する能力を有する公知の温血動物細胞としては、例えば、骨または軟骨への分化能を有する細胞あるいは既に分化形態を示している細胞が好ましく、具体的には軟骨細胞、繊維芽細胞（例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2）、筋芽細胞（例、マウス筋芽細胞株C2C12）などが用いられる。G111遺伝子を発現する能力を有する細胞の培養は、公知の動物細胞培養法と同様にして行われる。例えば、培地としては、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science)、122巻、501(1952)〕、DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology)、8巻、396(1959)〕、RPMI1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻、519(1967)〕、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine)、73巻、1(1950)〕等が用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えてもよい。発現誘導剤を接触させることによってG111遺伝子が発現する動物細胞を用いる場合には、該動物細胞を発現誘導剤の存在下または非存在下に培養することができる。

【0047】 mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング

(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法等に従って行うことができる。具体的には、G111タンパク質をコードするmRNAの量の測定は、公知の方法に従って細胞から抽出したRNAとG111遺伝子をコードするDNA (G111遺伝子DNA) もしくはその相補DNAまたはその部分DNAとを接触させ、G111

遺伝子DNAまたはその相補DNAに結合したmRNAの量を測定することによって行われる。G111遺伝子DNAの相補DNAまたはその部分DNAを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、G111遺伝子DNAの相補DNAに結合したG111mRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば³²P、³Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein, FAM (PE Biosystems社製)、J

OE (PE Biosystems社製)、TAMRA (PE Biosystems社製)、ROX (PE Biosystems社製)、Cy5 (Amersham社製)、Cy3 (Amersham社製) などの蛍光色素が用いられる。また、G111mRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換した後、G111遺伝子をコードするDNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAをプライマーとして用いるPCRによって、増幅されるcDNAの量を測定することによって行うことができる。G111mRNA

の量の測定に用いられるG111遺伝子DNAの相補DNAとしては、G111遺伝子DNA (上鎖) に相補的な配列を有するDNA (下鎖) があげられる。G111遺伝子DNAの部分DNAとしては、例えばG111遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列があげられる。G111遺伝子DNAの相補DNAの部分DNAとしては、例えば前記したG111DNAの部分DNAに相補的な配列を有するDNAがあげられる。即ち、例えばG111遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~2200個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列に相補的な配列を有するDNAがあげられ

る。PCRに用いられるプライマーとしては、例えば配列番号: 1で表される塩基配列を含有するDNAおよび配列番号: 2で表される塩基配列を含有するDNAなどがあげられる。G111 mRNAの量を増加させる試験化合物を、G111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物あるいは骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、またG111

mRNAの量を減少させる試験化合物を、G111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物あるいは骨

・軟骨分化調節 (特に阻害) 作用を有する化合物として選択することができる。

【0048】 上記①~③に示したスクリーニング方法において試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0049】 また、本発明は、④G111の公知プロモーターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニングし、適当なレポーター遺伝子の上位に連結させたDNAで形質転換した細胞 (例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞 (例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試験化合物の存在下で培養し、G111の発現に代えてレポーター遺伝子の発現を検出することの特徴とする。G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいてはG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (β-ガラクトシダーゼ遺伝子) などの染色マーカー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物として選択でき、逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0050】 また、本発明は、⑤G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することの特徴とする骨・軟骨分化調節 (促進または阻害) 作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。軟骨分化のマーカー遺伝子としてはI型Bコラーゲン遺伝子が好ましい。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量の測定は例えば配列番号: 5、6、7または8で表される塩基配列を有するプライマーを用いたRT-PCR法を実施することにより測定することができる。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を増加させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、また軟骨分化のマーカー遺伝子の発現

・軟骨分化調節 (特に阻害) 作用を有する化合物として選択することができる。

【0048】 上記①~③に示したスクリーニング方法において試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0049】 また、本発明は、④G111の公知プロモーターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニングし、適当なレポーター遺伝子の上位に連結させたDNAで形質転換した細胞 (例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞 (例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試験化合物の存在下で培養し、G111の発現に代えてレポーター遺伝子の発現を検出することの特徴とする。G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいてはG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (β-ガラクトシダーゼ遺伝子) などの染色マーカー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物として選択でき、逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0050】 また、本発明は、⑤G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することの特徴とする骨・軟骨分化調節 (促進または阻害) 作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。軟骨分化のマーカー遺伝子としてはI型Bコラーゲン遺伝子が好ましい。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量の測定は例えば配列番号: 5、6、7または8で表される塩基配列を有するプライマーを用いたRT-PCR法を実施することにより測定することができる。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を増加させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、また軟骨分化のマーカー遺伝子の発現

・軟骨分化調節 (特に阻害) 作用を有する化合物として選択することができる。

【0048】 上記①~③に示したスクリーニング方法において試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0049】 また、本発明は、④G111の公知プロモーターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニングし、適当なレポーター遺伝子の上位に連結させたDNAで形質転換した細胞 (例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞 (例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試験化合物の存在下で培養し、G111の発現に代えてレポーター遺伝子の発現を検出することの特徴とする。G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいてはG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (β-ガラクトシダーゼ遺伝子) などの染色マーカー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物として選択でき、逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0050】 また、本発明は、⑤G111タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を測定することの特徴とする骨・軟骨分化調節 (促進または阻害) 作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。軟骨分化のマーカー遺伝子としてはI型Bコラーゲン遺伝子が好ましい。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量の測定は例えば配列番号: 5、6、7または8で表される塩基配列を有するプライマーを用いたRT-PCR法を実施することにより測定することができる。軟骨分化のマーカー遺伝子の発現量を増加させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節 (特に促進) 作用を有する化合物として選択することができ、また軟骨分化のマーカー遺伝子の発現

・軟骨分化調節 (特に阻害) 作用を有する化合物として選択することができる。

【0048】 上記①~③に示したスクリーニング方法において試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0049】 また、本発明は、④G111の公知プロモーターやエンハンサー領域をゲノムDNAよりクローニングし、適当なレポーター遺伝子の上位に連結させたDNAで形質転換した細胞 (例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞 (例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞 (例、マウス筋芽細胞株C2C12) など) を試験化合物の存在下で培養し、G111の発現に代えてレポーター遺伝子の発現を検出することの特徴とする。G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御する作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいてはG111遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。レポーター遺伝子としては、例えば、lacZ (β-ガラクトシダーゼ遺伝子) などの染色マーカー遺伝子等などが用いられる。レポーター遺伝子産物 (例、mRNA、タンパク質) の量を公知の方法を用いて測定することによって、レポーター遺伝子産物の量を増加させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に促進) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物として選択でき、逆に、レポーター遺伝子産物の量を減少させる試験化合物をG111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御 (特に阻害) する作用を有する化合物、すなわちG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

量を減少させる試験化合物を、骨・軟骨分化調節（特に阻害）作用を有する化合物として選択することができる。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0051】また、本発明は、 α 1(I)タンパク質またはその部分ペプチドを発現する能力を有する細胞を試験化合物の存在下および非存在下に培養し、細胞の軟骨分化状態、例えば軟骨分化マーカーの発現を測定すること（特徴とする骨・軟骨分化調節（促進または阻害）作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。試験化合物としては、前記と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0052】さらに、 α 1(I)タンパク質は α 1(I)遺伝子自身の転写あるいは、脳もしくは肺の分化に関与するHNF-3 β 遺伝子の転写を誘導していると報告されている。したがって、例えば上記した①または②のスクリーニング方法を実施することにより直接的に α 1(I)タンパク質の転写活性を測定できるか、またはHNF-3 β を発現し得る細胞株を用いれば例えば上記した①または②に記載の方法に準じてHNF-3 β のmRNAの発現量を試験化合物の存在下および非存在下で測定し、比較することにより α 1(I)タンパク質の転写活性を測定することも可能である。

【0053】本発明のスクリーニング用キットには上記スクリーニング方法を実施するため、上記の α 1(I)タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、または α 1(I)遺伝子またはその産物を産生する能力を有する細胞、または α 1(I)遺伝子発現レポーターベクターを導入した細胞（ α 1(I)遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞）、および α 1(I)遺伝子DNAもしくはその担体DNAまたはその部分DNAを含有するものである。

【0054】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、 α 1(I)遺伝子の発現を制御（促進または阻害）する活性を有する化合物あるいは α 1(I)遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御（促進または阻害）する作用を有する化合物、ひいては骨・軟骨分化調節作用を有する化合物である。該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）等との塩が挙げられる。 α 1(I)遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物（または α 1(I)遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を促進する作用を有する化

合物、骨・軟骨分化誘導作用を有する化合物）またはその塩は、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患

（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨・軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建）、骨粗鬆症などの予防・治療剤などの医薬として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤などの医薬としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、 α 1(I)遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物（または α 1(I)遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を阻害する作用を有する化合物、骨・軟骨分化阻害作用を有する化合物）またはその塩は、例えば骨・軟骨形成過剰症などの治療・予防剤などの医薬として使用できる。

【0055】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合は、常套手段に従って実施することができる。例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとして、経口的または非経口的に投与することができる。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど；好ましくは哺乳動物）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で α 1(I)遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～1.00mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で α 1(I)遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。一方、骨・軟骨形成過剰症の治療目的で α 1(I)遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1～1.00mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対

10

20

30

40

50

象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、骨・軟骨形成過剰症の治療目的でG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0056】(3) アンチセンススクレオチドを含有する医薬（骨・軟骨分化阻害剤）または診断剤（骨・軟骨疾患の診断剤）

本発明で用いられるDNAに相補的に結合し、前記DNAの発現を抑制することができる本発明で用いられるアンチセンススクレオチド（例、アンチセンスDNA）は低毒性であり、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能抑制することができるので、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの治療・予防剤などとして使用することができる。上記アンチセンススクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合は、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。例えば、前記アンチセンススクレオチドを用いる場合、前記アンチセンススクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、温血動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど、好ましくは哺乳動物）に対して経口的または非経口的に投与することができる。前記アンチセンススクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やマイクロカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。前記アンチセンススクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、骨・軟骨形成過剰症の治療の目的で本発明で用いられるアンチセンススクレオチドを経口投与する場合、成人（体重60kg）に対し、一日につき前記アンチセンススクレオチドを約0.1～100mg投与する。さらに、前記アンチセンススクレオチドは、組織や細胞における本発明で用いられるDNAの存在やその発現状況を知るための診断用オリゴスクレオチドプローブとして使用することもできる。上記アンチセンススクレオチドと同様に、二本鎖RNA、リボザイム、デオイオリゴヌクレオチドなども、前記DNAの発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能抑制することができるので、例えば、骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤などとして使用することができる。二本鎖RNAは、公知の方法（例、

Nature, 411巻、494頁、2001年）に従って、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻、221頁、2001年）に従って、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。デオイオリゴヌクレオチドは、公知の方法（例、The Journal of Clinical Investigation, 105巻、1071頁、2000年）に従って、本発明で用いられるDNAの配列を基に設計して得られる。G111は転写因子であるのでG111の結合配列を含むデオイG111バインディングオリゴヌクレオチド（例えば5'-GAACACCA-3'（Kinzie KW, Vogelstein B., Mol Cell Biol 1990 Feb;10(2): 634-42)を含有するオリゴヌクレオチドなど）などを有効に使用できる。上記の予防・治療剤として使用する場合は、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。

【0057】(4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAまたはアンチセンスDNAは、プローブとして使用することにより、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAまたはアンチセンスDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics）, 第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA）, 第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現低下が検出された場合は、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、ノーザンハイブリダイゼーションにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするmRNAの発現過多が検出された場合は、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

【0058】(5) G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の抗体を用いた診断剤
G111タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの

瘍の抗体（以下、本発明の抗体と略称する場合がある）は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i)本発明の抗体と、被検液および標識化タンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化タンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、(ii)被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

【0059】本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')₂、Fab'、あるいはF_{ab}も画分を用いてもよい。本発明のタンパク質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、¹²⁵I、¹²⁵I、³H、¹⁴Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルンゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0060】抗原あるいは抗体の不溶化に当たっては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロー

ス、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）した後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、タンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0061】本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加えて未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が低くあり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0062】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の

条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和59年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川榮治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）、「メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in ENZYMOLOGY) [Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A)), 同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B)), 同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C)), 同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), 同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参照。以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のタンパク質等を定量することによって、上記したような各種骨・軟骨疾患の診断をすることができる。例えば、上記の定量法を用いることにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの濃度減少が検出された場合は、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。一方、上記の定量法を用いることにより本発明のタンパク質またはその部分ペプチドの濃度上昇が検出された場合は、例えば、骨・軟骨形成過剰症などの疾患である可能性が高いまたは将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0063】 (6) DNA転移動物

本発明は、外来性の本発明のタンパク質等をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1) 本発明の外来性DNAまたは

その変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、(2) 非ヒト哺乳動物がゲン動物である第(1)記載の動物、(3) ゲン動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターを提供するものである。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-セキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上記の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作成することもできる。

【0064】 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲン動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F1系統、BDF1系統、B6D2F1系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar, SDなど）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどが挙げられる。本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本

発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0065】本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、λファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、②各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンIⅠ、ウロプラキニンIⅠ、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア繊維性酸性タンパク質、グルクチオンS-ートランスフェラーゼ、血小板由来成長因子β、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびIⅠ型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼβIサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムATPase、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIⅠA、メタロプロテイナーゼI組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、パンプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1α（EF-1α）のプロモーター、ヒトおよびマウスβアクチンプロモーターなどが好適である。

【0066】上記ベクターは、DNA転移哺乳動物にお

いて目的とするmRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、各種哺乳動物（例えば、ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、繊維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、繊維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域は転移動物において発現するDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常の遺伝子工学的手法により作製することができる。受精細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

【0067】本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。受精細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。本発明の正常DNAを

有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症（例、転写、骨・軟骨分化誘導などの亢進症）を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

【0068】一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確立して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常の遺伝子工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴット動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外來異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

【0069】また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、①組織培養の

ための細胞源としての使用、②本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたタンパク質組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、④上記②記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性化型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0070】（7）ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、（1）本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

（2）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、（3）ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、（4）非ヒト哺乳動物がげっ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、（5）げっ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、（6）本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、（7）該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子）を導入することにより不活性化され、該レポ-

ター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、

(8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(6)項記載の非ヒト哺乳動物、(9) ゲッ歯動物がマウスである第(8)項記載の非ヒト哺乳動物、および(10) 第

(7)項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0071】本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他のDNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを複製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β-ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、ポリA付加シグナルなど)を挿入し、完全なmRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA細胞(以下、ターゲットティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲットティングベクター上のDNA配列とターゲットティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができ。

【0072】また、相同組換え法等により本発明のDN

Aを不活性化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF1マウス(C57BL/6とDBA/2とのF1)を用いて樹立したものなども良好に用い得る。BDF1マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は網膜モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例として挙げることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁵個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雌雄の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0073】また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が2n=40である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1~10000U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001~0.5%トリプ

シン/0.1-5mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり (M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, ナイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; C. R. Martin, プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら, ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第97巻、27頁、1985年)、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0074】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のD

NA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同士を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選別することにより得られる。

【0075】このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0076】(7a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、口蓋裂)、骨粗鬆症などの疾患に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする。本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法に

において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが挙げられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。例えば、GLI1遺伝子発現不全に起因して起こるような軟骨損傷治療不全に対して治療・予防効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に骨・軟骨損傷処置（例えば、骨折など）を行ない、骨・軟骨損傷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の軟骨分化マーカーの発現量、体重変化などを経時的に測定する。該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の軟骨分化マーカーが約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上上昇した場合、該試験化合物を軟骨損傷に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

【0077】本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患（例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患）、歯科領域の疾患（例、口蓋裂）、骨粗鬆症などの疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例アルカリ金属）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蘇酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。該スクリーニ

ング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質の活性を調節する化合物を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たり換算した量を投与することができる。

【0078】（7b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物をスクリーニング方法本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものが挙げられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

【0079】例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりに β -ガラクトシダーゼが発現する。従って、例

えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄すること

によって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、電法に従い、lacZをコードするmRNAを抽出してもよい。

【0080】上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸)や塩基(例、有機酸)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、乳酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を促進し、該タンパク質の機能を促進することができるので、例えば、骨・軟骨疾患、例えば整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)、歯科領域の疾患(例、口蓋裂)、骨粗鬆症などの疾患などに対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬品として有用である。

【0081】該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、哺乳動物(例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20

mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、軟骨損傷の治療目的で本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのタンパクを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。また該プロモーター部分を解析することにより新たなシスエレメントやそれに結合する転写因子を見つけることも可能である。

【0082】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン

57

Cys : システイン
 Met : メチオニン
 Glu : グルタミン酸
 Asp : アスパラギン酸
 Lys : リジン
 Arg : アルギニン
 His : ヒスチジン
 Phe : フェニルアラニン
 Tyr : チロシン
 Trp : トリプトファン
 Pro : プロリン
 Asn : アスパラギン
 Gln : グルタミン
 pGln : ピログルタミン酸

【0083】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】G111 mRNAの量を測定する際に使用できるPCR用プライマーを示す。（実施例4および5）

【配列番号：2】G111 mRNAの量を測定する際に使用できるPCR用プライマーを示す。（実施例4および5）

【配列番号：3】マウスG111 cDNAの取得のために使用したプライマーを示す。

【配列番号：4】マウスG111 cDNAの取得のために使用したプライマーを示す。

【配列番号：5】実施例1、2および4のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：6】実施例1、2および4のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：7】実施例3のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：8】実施例3のRT-PCRで使用したプライマーを示す。

【配列番号：9】マウスG111遺伝子（cDNA）の塩基配列を示す。

【配列番号：10】マウスG111タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：11】ヒトG111タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：12】ヒトG111遺伝子（cDNA）の塩基配列を示す。

【配列番号：13】ヒトG111変異タンパク質1のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：14】ヒトG111変異遺伝子1（cDNA）の塩基配列を示す。

【配列番号：15】ヒトG111変異タンパク質2のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：16】ヒトG111変異遺伝子2（cDNA）の塩基配列を示す。

58

【配列番号：17】ヒトG111変異タンパク質3のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：18】ヒトG111変異遺伝子3（cDNA）の塩基配列を示す。

【配列番号：19】マウスG113タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：20】マウスG113遺伝子（cDNA）の塩基配列を示す。

10 【配列番号：21】ヒトG113タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【配列番号：22】ヒトG113遺伝子（cDNA）の塩基配列を示す。

【0084】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はそれらに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作は、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）に記載されている方法に従い、各種キット類の使用法は添付されているマニュアルに従った。

20 【0085】まず実施例に用いたG111およびScleraxis発現ベクターの作製方法、細胞培養条件、遺伝子導入法を以下に示す。

【G111発現ベクターの調製】マウス19日胎児ライブラリーより配列番号：3および4に示すプライマーを使用し、PfuTurbo(Stratagene)DNA polymeraseを用いてPCR法にてマウスG111 cDNAを得た。得られた断片はpCRblunt（Invitrogen）ベクターにクローニング後、塩基配列を決定した。その結果、得られた遺伝子は公知のマウス遺伝子であるAF026305とはアミノ酸レベルで24個、またAB026922とは同じく2個の異なる配列を有していた〔DNA配列：配列番号：9（マウスG111遺伝子の塩基配列は具体的には配列番号：9の第213番目のAから第354番目のCまでの塩基配列）。タンパク質のアミノ酸配列：配列番号：10および図1〕。次にこのベクターをNotI、HindIIIで消化し、pCDNA3.1（Invitrogen）にG111断片をサブクローニングすることによって動物細胞発現ベクターを調製した。

【Scleraxis発現ベクターの調製】Scleraxisは骨・軟骨分化に関与することが報告されているが(Liu, Y. et al. J. Biol. Chem. (1997) 272, 29880-29885)、その機能の詳細は不明なところが多い転写因子である。マウスライブラリーよりPCR法にてマウスScleraxis cDNAを得た。得られた断片はpCRblunt（Invitrogen）ベクターにクローニング後、BamHI-XhoIで消化し、pCDNA3.1（Invitrogen）にScleraxis断片をサブクローニングすることによって動物細胞発現ベクターを調製した。

50 【細胞培養法】マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2

株、およびマウス胚芽細胞種C2C12はATCCより購入し、10% FBSを含むDMEM (GIBCO) にて培養した。ヒト正常軟骨細胞は東洋紡より購入しヒト正常軟骨細胞培養キットに含まれるChondrocytes growth mediumを用い、細胞培養ディッシュ (Falcon) で培養した。なお、この細胞はディッシュで培養しているため脱分化しており、軟骨細胞マーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子は発現しなくなっている。

【遺伝子導入法】ウェルあたり約15万個の細胞を24ウェルプレートに播き、翌日上記発現ベクターとFugene 6 (ベリンガー) を混和し、各種細胞に添加することによってトランスフェクションした。

【化合物添加法】ウェルあたり約20万個の細胞を24ウェルプレートに播き、2時間後、ジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した9-(2-Tetrahydrofuryl)adenine (THFA) を添加した。最終DMSO濃度は0.1% (v/v) 以下とした。

【発現量比較】トランスフェクション、あるいは化合物添加後2日目にRNeasy mini kit (Qiagen) を用いてRNAを抽出し、message clean kit (genhunter) でDNase処理した後、RNA PCR kit (Takara) に従いRT-PCRを行った。反応後、アガロースゲルにて電気泳動し、Gel image (Genomic solutions) を用いて目的のバンドの比較を行った。

【0086】実施例1 G111発現ベクター導入によるマウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1をC3H10T1/2細胞株にトランスフェクション後、2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ軟骨分化のマーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現が、ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) を導入した場合を1とするとG111を導入すると3.0を示した。また、この時間時にSonic hedgehog, Indian hedgehogおよびScleraxisの発現を見たが、全く発現を認めなかった。

【0087】実施例2 G111発現ベクター導入によるマウスC2C12細胞の軟骨分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1をC2C12細胞株にトランスフェクション後2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA3.1を導入した場合Col2a1を全く発現していなかったのに対し、G111遺伝子を導入することによってCol2a1の発現を認めた。

【0088】実施例3 G111発現ベクター導入による脱分化型ヒト正常軟骨細胞の再分化に及ぼす影響

G111発現ベクターまたはpcDNA3.1を脱分化型ヒト正常軟骨細胞にトランスフェクション後2日目に

配列番号：7および8に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ、この細胞はベクターpcDNA3.1を導入した場合Col2A1を全く発現していなかったのに対し、G111遺伝子を導入することによってCol2A1の発現を認めた。

【0089】実施例4 マウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼすScleraxis遺伝子の発現による軟骨分化に及ぼす効果

マウスC3H10T1/2細胞の軟骨分化に及ぼすG111以外の転写因子の発現による軟骨分化に及ぼす効果を見るために、Scleraxis遺伝子をトランスフェクションした。トランスフェクション2日目に配列番号：5および6に示すプライマーを用いてRT-PCRを行ったところ軟骨分化のマーカーであるI型Bコラーゲン遺伝子 (Col2a1) の発現が、ベクターpcDNA3.1を導入した場合の約2倍向上していた。この時間様にScleraxis遺伝子発現によるG111遺伝子の発現を配列番号：1および2に示すプライマーを用いて見たところpcDNA3.1を導入した場合の約2.5倍向上していることがわかった。このことはScleraxisの軟骨分化に対する効果はG111の発現上昇に起因することを示唆しているが、Sonic hedgehogおよびIndian hedgehogはこの条件ではいずれも発現しておらず、Scleraxisはヘッジホッグを介さずにG111を誘導しうることがわかった。即ちヘッジホッグタンパク質を用いなくともG111を介した軟骨分化を誘導しうることが明らかとなった。

【0090】実施例5 G111発現を誘導する低分子化合物の探索

C3H10T1/2細胞を用いてG111発現を誘導する低分子化合物を探索した。その結果、9-(2-Tetrahydrofuryl)adenine (THFA) を500 μ Mで添加すると2日後にはG111遺伝子の発現はDMSO添加時に比べ約2.3倍向上していることが配列番号：1および2に示すプライマーを使用したRT-PCRにてわかった。この時Col2a1の発現も約2.3倍向上していた。この場合もScleraxisやSonic hedgehog, Indian hedgehogの発現は認められず、THFAの軟骨分化誘導効果はヘッジホッグタンパクを介さずにG111を誘導することに起因していることがわかった。以上の結果より、G111の発現の増減を指標として選択される化合物は骨・軟骨疾患予防、治療薬として有望であることが判明した。また上記の実験はマウスの遺伝子を用いて実施されたが、ヒトの遺伝子とマウスの遺伝子には非常に高い相同性があることは既知であり、ヒトの遺伝子を用いてもこれらの結果と同様の結果が得られることは容易に予測できる。

【0091】

【発明の効果】G111遺伝子またはその産物は骨あるいは軟骨分化誘導活性をするため、整形外科領域の疾患

(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)または、歯科領域の疾患(例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建)、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。また、G111タンパク質等を用いたスクリーニング方法、G111遺伝子を発現する能力を有する細胞を用いたスクリーニング方法またはレポーター遺伝子発現形質転換体を用いたスクリーニング方法は、G111遺伝子の発現を制御(促進または阻害)する活性を有する化合物、G111遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサーの活性を制御(促進または阻害)する作用を有する化合物、骨・軟骨分化調節(促進または阻害)作用を有する化合物、またはそれらの塩の探索に用いることができる。このような化合物を用いてG111遺伝子またはその産物の作用(例、転写活性)を増強ま

10

*20

*または活性化することによって骨・軟骨分化を誘導することができる。上記スクリーニングにより得られうるG111遺伝子の発現を促進する活性を有する化合物などは骨、あるいは軟骨誘導活性を有するため、整形外科領域の疾患(例、骨折、変形性関節症、骨関節炎、半月板損傷等の軟骨損傷、外傷、腫瘍摘出などによる骨、軟骨欠損部の再生、脊椎固定術、脊柱管拡大術などの骨再建、骨形成不全症、軟骨無形成症などの先天性骨・軟骨疾患)または、歯科領域の疾患(例、口蓋裂、下顎骨再建術、歯槽堤形成術などの骨再建)、さらには骨粗鬆症などの予防・治療剤として用いることができる。また、美容外科領域における骨移植の治療剤としても用いることができるし、再生医療における自家移植の際の分化誘導剤としても利用できる。一方、上記スクリーニングにより得られうるG111遺伝子の発現を阻害する活性を有する化合物やG111遺伝子のアンチセンスDNAなどは、例えば骨・軟骨形成過剰症の予防・治療剤として用いることができる。

【0092】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> Takeda Chemical Industries, Ltd.
 <120> Use of G111 gene
 <130> P2001-179
 <140>
 <141>
 <150> JP 2000-242767
 <151> 2000-8-4
 <152> 22
 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111
 <400> 1
 AGACTGCCGC TGGGATGGTT GC 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111
 <400> 2
 TCCGCTGGAT GCGCTGGT CA 22
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111

<400> 3

TTGAGGTGG GATGAAGAAG CAGT 24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding G111

<400> 4

AATACAGCCC CCAGCCCAAA CCT 23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse Col2
a1

<400> 5

GCTCATCGCC GCGGTCCTAC G 21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding mouse Col2
a1

<400> 6

CTGCCAGGT TGCCAGGAT TG 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human Col2
a1

<400> 7

CCCGGCACT CCTGGCACTG AT 22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding human Col2
a1

<400> 8

CTCGGACCC TCGGCTCCT TTAG 24

<210> 9

65

<211> 3635

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 9

TTGAGGTTGG GATGAGAGAG CAGTGGGAC GGCAGCTGG AGGTCTGCT GGTAGAGGGA 60
 ACTCCAGAGA CTGTGGATCC CCAAGACTGA AGGCTGCTT CTGCCACTC TTGGGATGT 120
 TTCTCTTAA GGAAGCTGAA AANNTTATT GATTTCATG ACCAGTTTCT GAGATGAGGG 180
 TTAGAGTCC CTCATCTCTT CXTGAGAGG CCATGTTCAA TCCAATGACT CCGCCACAAG 240
 TCAATAGCTA TGGTAGGCA TGCTGTCTCC GACCCCTCCA CAGCCAAGGA GTCCCAAGCA 300
 TGGGAACAGA AGGACTTTCT GGTCTGCCCT TTTGCCACCA AGCCAACCTT ATGTCAGGGT 360
 CCCAGGGTTA TGGAGCAGCC AGAGAGACCA GCAGCTGCAC TGAAGGATCT CTCTTTCTCT 420
 CTCTCTCTT TCCTGGAGT TCACTCAAA TAACAAAGAA CCGGCTCTC TCACTCTCC 480
 CCGTTCTGA TGCCAGCTC GACCTGCAAA CGTAATCCG GACCTCACCC AGCTCCCTGG 540
 TGCTTTTAT CAAGCTCTGG TGTACATCTC CGGCGGTTT CTACGGCCAT CTCTCCATTG 600
 GTACCATGAG CCTTCTTTA GATTTCAC CACAGATGAG TCATCAAAA GGAATTCAC 660
 CTCTCTATGG AGTCCAGGCC TGCTGTCCAC ATGACTCTAC TCGGGTTCA ATGATGCTTC 720
 ACCCCAGGG CCGGAGCCA CGTGCAACCT GGCAGTGAA GTCAGAGCTG GATATGATGG 780
 TTGGCAAGTG CCGGAGGAG CCTTGGAG GGGACATGT TAGCCCAAC TCCACAGCCA 840
 CACAGGATCA CTTGTTGGG ATGCTGGATG GGGGGAGGA CTGGAGAGA GAGGAGAGG 900
 CTGAGCTGA GTCTGTGTAT GAGACAGACT GCGCTGGCA TGGTTGCAGC CAGGAGTTGG 960
 ATTCCAGGA GCAGCTGGT CACCACATCA AAGTGAGCA TATCCAGGG GAGCGAAGG 1020
 AATTCTGTG CCATTGGGGA GATTGCTCA GGGAGCTGAG GCGCTTCAAG CCCCATACA 1080
 TGCTGTGGT GCATGCGC AGACACAGG GCGAGAAGC ACACAAGTC AGCTTTGAAG 1140
 GCTGTGGAA GTCTATTTA GCGCTGAAA ACCTCAAGAC GCACCTTGG TGCACAGCG 1200
 GTGAGAAGC TTACATGTG GAGCAAGAG GTTGCAGCA GCGCTTTAGC AATGCCAGTG 1260
 ACCCGGCCAA GCACAGAA CTGACCACT CCAATGAGAA GGCATACGTG TGCAAGCTCC 1320
 CCGCTGAC CAAGCTTAC ACAGATCCA GCTGCTCCG CAAACAGTG AAGACAGTC 1380
 ATGTTGGA TGCCAGTG ACCAAGCGG ATCGAGGGA TGCCCTTTC CACCGGCTC 1440
 AGCCCTCTC CAGATGGAG CCAAGCGG AAGGGAGAG AGGATCGGC AGGGAAGGA 1500
 GCAGACTGAC TGTCCTGAG AGTCCATGC GGCAGAGAG CCGCGAGCG CAGTCTCTT 1560
 GCAGCAGGA CCACTCCCA GAGGCGAGT GCGCAACAC GGCAGCGGC GTGAGATGG 1620
 CCGCAACGC CCGGGCAGC ACTGAGGACT TGTCCAGCTT GATGAAGGA CCTTGTGTCT 1680
 CCGCCAGCG ACTCTCAG CTGCGCGGC TGGAGAAGCT TAGGCTGGAT CAGCTGCATC 1740
 AGCTCGGCC CATAGGCTT CCGGCTCTA AACTGCCAG CTTAAGCCAC GCTGGCTCAC 1800
 CTGTCTCTG CCGTCTGAG CCGCAGCTT CMTGAGCG CCGCAGCAG AGTCCAGCA 1860
 GCATGAGCTC TGCTTACCA GTCAGCGCA GCTCTCCCT GGCATCCCT TTCCCGCGG 1920
 GAACCCAGC AGAGAATGG GCATGTCAC TACCTGGCT CACACCTCT CAGCACTACA 1980
 TGCTTGGTC CAGATATGT TCAGCCAGG GAGTGGCAC CCGCCCACT GCAGCTCACA 2040
 GCTGGATCG GATGGGAGG CTTCCTGTC CTCCTGGAG AAGCCGAACC GACTACCGG 2100
 GATACAACCC AATGCAGG GTCATGGA GGGCAGTGA CCGAGCCCG GCTGCTGACC 2160
 AGCCAGCTCC AGCCAGATC CAGGCTTCA AGAGCTGGG ATGTGTCCAC AGCCCCCTA 2220
 GTGTGGCAAC AGGACGAACT TTGATCCCC ACCACCTAC CTCTGTCTAT TCGCCACAGC 2280
 CCGCAGCAT CACGAAAT GTTGCATGG ATACTAGGG GCTACAGAG GAGCCAGAGG 2340
 TTGGAATTC CTTGATGGG AATGCTCTG ACCATACAT GATTTTTTC TCCACTGATA 2400
 CTCTGGATA TGGGGACCC GAGGGGACG CAGCTGAGCC TTATGAAGT AGGGTCCAG 2460
 GTTCCCTGCC TCTTGGGCT GGTCCACCA CCACTATGG CCGTGGCCAC TGTGCCAGC 2520
 AGGTCTCTA TCTGATGCC ACCCAGAAA ACTGGGGTGA GTTCCCTTCT CATGCTGGG 2580
 TGTACCTAG CAATAAGGT CCGGCTGCT CTTATAGCCA GTGTCTTGA CTGAGCAAT 2640
 ATGACAAAT GCAGTAAAA CCAGAACAG GTGCTCAGT GGGGTCTGAC TCCACCGAT 2700
 TGGACGCTG CTCAATGCC CAGCCAGTG AAGGTCGCC AGCCCGCAG CTCTGTGTTT 2760

66

67

68

CACATCATCC CCAGCTCCT CAGCCCCAGT ATCCCCAGTC GGGTCCCTAT CCTCAGCCTC 2820
 CCCATGGTTA TCTCTCAACA GAACCCAGGC TTGGCCTCAA TTTCAGCCGC TCCTCCTCTC 2880
 ATTCCACAGG ACAGCTCAAA GCTCAGCTGG TGTGTAATTA CGTTCAGTCG CAGCAGCAAT 2940
 TGTGTGTGGA GGGAGAAAC CCGGGAGGGC TCCCAACCA GGAAGTUDCA TACCAAGGCC 3000
 CCAAGTTTCT GGGGGGTTC CAAGTTAGTC AGAGCCCTGC CAAGACCCCA GCAGCAGCGG 3060
 CCGCAGCATA TGAATCTGGC TTTCACCTG CTTCGGCCAA TCACAAATCA GGCTCCTATC 3120
 CTGCCCTTC ACCCTCCAT GAACTTTCA CCGTGGGAGT AAACAGGCTT TCCACAGGC 3180
 CAGCAGCACC ACCCTGACTT CTGCCCCGC TGTCCCTTG CTATGGGCC CTCAAGGTGG 3240
 GGGATACCAA CCCAGCTGT GGCATCTG AGGTGGGAG GTTAGGAGCA GGCCTTGCT 3300
 TGTACCTCC TCCTGAAGGG CAGGTGTGA ACGCTCTGGA CTCTCTTGAC CTGGACAACA 3360
 CTCAGCTGGA CTCTGTGCT ATCTAAGAT AGGCCAGGG CCTGAGGCT CTCTTTTCCC 3420
 ATGAGCAAGG GGACAGCTCT AAAAACACCC CATCTCCCTC TGGGCCCCGC AACATGGCAG 3480
 TGGTAACAT GAGTGTCTG CTGGGCTCT TGCCTGGAGA GACACAAATC CTCAACTCTA 3540
 CTGCTAATA GGTAAAGGA CCAAGACAG ATGGTATTTT CTAATGGCT ACATGAGGTG 3600
 CCCAGGGATG CGAGGTTTG GCTGGGGCT GTATT 3635

<210> 10

<211> 1111

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 10

Met Phe Asn Pro Met Thr Pro Pro Gln Val Asn Ser Tyr Gly Gln Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu His Ser Gln Gly Val Pro Ser Met Gly Thr
 20 25 30
 Gln Gly Leu Ser Gly Leu Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Phe Met Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gln Gly Tyr Gly Ala Ala Arg Gln Thr Ser Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Ser Leu Phe Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ser Ser Val Lys Leu
 65 70 75 80
 Thr Lys Lys Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu
 85 90 95
 Asp Leu Gln Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe
 100 105 110
 Ile Asn Ser Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser
 115 120 125
 Ile Gly Thr Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Pro Gln Met Ser His
 130 135 140
 Gln Lys Gly Thr Ser Pro Pro Tyr Gly Val Gln Pro Cys Val Pro His
 145 150 155 160
 Asp Ser Thr Arg Gly Ser Met Met Leu His Pro Gln Ala Arg Gly Pro
 165 170 175
 Arg Ala Thr Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Met Val Gly Lys
 180 185 190
 Cys Pro Glu Asp Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr
 195 200 205
 Gly Thr Gln Asp His Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu
 210 215 220
 Glu Arg Glu Glu Lys Pro Glu Pro Gln Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys
 225 230 235 240

Arg Trp Asp Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val
 245 250 255
 His His Ile Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val
 260 265 270
 Cys His Trp Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln
 275 280 285
 Tyr Met Leu Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His
 290 295 300
 Lys Cys Thr Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys
 325 330 335
 Glu Gln Glu Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala
 340 345 350
 Lys His Gln Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys
 355 360 365
 Leu Pro Gly Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys
 370 375 380
 His Val Lys Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His
 385 390 395 400
 Arg Gly Asp Gly Pro Leu Pro Arg Ala Gln Pro Leu Ser Thr Val Glu
 405 410 415
 Pro Lys Arg Glu Arg Glu Gly Gly Ser Gly Arg Glu Glu Ser Arg Leu
 420 425 430
 Thr Val Pro Glu Ser Ala Met Pro Gln Gln Ser Pro Gly Ala Gln Ser
 435 440 445
 Ser Cys Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp
 450 455 460
 Ser Gly Val Glu Met Ala Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu
 465 470 475 480
 Ser Ser Leu Asp Glu Gly Pro Cys Val Ser Ala Thr Gly Leu Ser Thr
 485 490 495
 Leu Arg Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Glu Leu Arg
 500 505 510
 Pro Ile Gly Ser Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Thr His Ala Gly
 515 520 525
 Ala Pro Val Ser Arg Arg Leu Gly Pro Pro Val Ser Leu Asp Arg Arg
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ser Met Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg
 545 550 555 560
 Ser Ser Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Thr Pro Pro Glu Asn Gly
 565 570 575
 Ala Ser Ser Leu Pro Gly Leu Thr Pro Ala Gln His Tyr Met Leu Arg
 580 585 590
 Ala Arg Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Ser Gly Thr Pro Pro Thr Ala Ala
 595 600 605
 His Ser Leu Asp Arg Met Gly Gly Leu Ser Val Pro Pro Trp Arg Ser
 610 615 620
 Arg Thr Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg
 625 630 635 640

Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ala Ala Asp His Pro Ala Pro Ala Arg Val
 645 650 655
 Gln Arg Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Ser Val Ala
 660 665 670
 Thr Gly Arg Asn Phe Asp Pro His His Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro
 675 680 685
 Gln Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Val Ala Met Asp Thr Arg Gly Leu
 690 695 700
 Gln Glu Glu Pro Glu Val Gly Thr Ser Val Met Gly Asn Gly Leu Asn
 705 710 715 720
 Pro Tyr Met Asp Phe Ser Ser Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro
 725 730 735
 Glu Gly Thr Ala Ala Glu Pro Tyr Glu Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu
 740 745 750
 Pro Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Gly His Cys Ala
 755 760 765
 Gln Gln Val Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Pro Glu Asn Trp Gly Glu Phe
 770 775 780
 Pro Ser His Ala Gly Val Tyr Pro Ser Asn Lys Ala Pro Gly Ala Ala
 785 790 795 800
 Tyr Ser Gln Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys
 805 810 815
 Pro Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro
 820 825 830
 Cys Leu Asn Ala His Pro Ser Glu Gly Ser Pro Gly Pro Gln Pro Leu
 835 840 845
 Phe Ser His His Pro Gln Leu Pro Gln Pro Gln Tyr Pro Gln Ser Gly
 850 855 860
 Pro Tyr Pro Gln Pro Pro His Gly Tyr Leu Ser Thr Gln Pro Arg Leu
 865 870 875 880
 Gly Leu Asn Phe Asn Pro Ser Ser Ser His Ser Thr Gly Gln Leu Lys
 885 890 895
 Ala Gln Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Gln Gln Glu Leu Leu Trp
 900 905 910
 Gln Gly Arg Asn Arg Gly Gly Leu Pro Asn Gln Glu Leu Pro Tyr Gln
 915 920 925
 Ser Pro Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Gln Ser Pro Ala Lys
 930 935 940
 Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Gly Ser Gly Phe Ala Pro Ala
 945 950 955 960
 Ser Ala Asn His Lys Ser Gly Ser Tyr Pro Ala Pro Ser Pro Cys His
 965 970 975
 Glu Thr Phe Thr Val Gly Val Asn Arg Pro Ser His Arg Pro Ala Ala
 980 985 990
 Pro Pro Arg Leu Leu Pro Pro Leu Ser Pro Cys Tyr Gly Pro Leu Lys
 995 1000 1005
 Val Gly Asp Thr Asn Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu
 1010 1015 1020
 Gly Ala Gly Pro Ala Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn
 1025 1030 1035 1040

73

74

Ala Leu Asp Ser Leu Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala
 1045 1050 1055
 Ile Leu Asp Gln Ala Gln Gly Leu Ser Pro Pro Leu Ser His Glu Gln
 1060 1065 1070
 Gly Asp Ser Ser Lys Asn Thr Pro Ser Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met
 1075 1080 1085
 Ala Val Gly Asn Met Ser Val Leu Leu Gly Ser Leu Pro Gly Glu Thr
 1090 1095 1100
 Gln Phe Leu Asn Ser Ser Ala
 1105 1110
 <210> 11
 <211> 1106
 <212> PRT
 <213> Human
 <400> 11
 Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
 20 25 30

 Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser
 35 40 45
 Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asn Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln
 85 90 95
 Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser
 100 105 110
 Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr
 115 120 125
 Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr
 165 170 175
 Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu
 180 185 190
 Glu Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Gln
 195 200 205
 Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu
 210 215 220
 Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys Arg Trp Asp
 225 230 235 240
 Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val His His Ile
 245 250 255
 Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp
 260 265 270

75

76

Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu
 275 280 285
 Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr
 290 295 300
 Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr
 305 310 315 320
 His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Glu His Glu
 325 330 335

 Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Gln
 340 345 350
 Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly
 355 360 365
 Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys
 370 375 380
 Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp
 385 390 395 400
 Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg
 405 410 415
 Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro
 420 425 430
 Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys
 435 440 445
 Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly
 450 455 460
 Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg
 485 490 495

 Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile
 500 505 510
 Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr
 515 520 525
 Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser
 565 570 575
 Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg
 580 585 590
 Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser
 595 600 605
 Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala
 610 615 620
 Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser
 625 630 635 640
 Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg
 645 650 655

Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln
 675 680 685
 Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln
 690 695 700
 Glu Glu Pro Glu Val Gly Thr Ser Met Val Gly Ser Gly Leu Asn Pro
 705 710 715 720
 Tyr Met Asp Phe Pro Pro Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Gln
 725 730 735
 Gly Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu Pro
 740 745 750
 Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Asn Pro Cys Pro Gln
 755 760 765
 Glu Ala Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Glu Thr Trp Gly Glu Phe Pro
 770 775 780
 Ser His Ser Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Lys Ala Leu Gly Gly Thr Tyr
 785 790 795 800

 Ser Gln Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys Pro
 805 810 815
 Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro Cys
 820 825 830
 Leu Asn Ala His Pro Ser Glu Gly Pro Pro His Pro Gln Pro Leu Phe
 835 840 845
 Ser His Tyr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Gln Ser Gly Pro
 850 855 860
 Tyr Thr Gln Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Pro Ser Gln Pro Arg Pro Cys
 865 870 875 880
 Leu Asp Phe Asp Ser Pro Thr His Ser Thr Gly Gln Leu Lys Ala Gln
 885 890 895
 Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Glu Glu Glu Leu Leu Trp Glu Gly
 900 905 910
 Gly Gly Arg Glu Asp Ala Pro Ala Gln Gln Pro Ser Tyr Gln Ser Pro
 915 920 925
 Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960

 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990
 Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Gln Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040

Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala Ile Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Gln Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100

Ser Ala

1105

<210> 12

<211> 3600

<212> DNA

<213> Human

<400> 12

ccagacac agcccgag ccgcatcc gagccagcg ccagacaga gtgtccccc 60
 accctccctt gaggcccat gtccaactg atgacccac caaccatcg tagctatggc 120
 gagactgt gtctccggc cctcccagt caggaggcc ccagtggtg gacagaaggc 180
 ctgtctggc cgccttcg ccacacgtt aactcatgt ccgcccaca cagtatggc 240
 ccagccagc agccacacg ctgcacgag gccacactt ttctctcc ccggagtgc 300
 gtcagttgc ccagagcgg ggcactgct atctacctc tgcggaigc cagccaggc 360
 ctgcagagc ttatccgac ctacccagc tccctgtag ctctatcac ctgcagtc 420
 aactctccg gaggctcca cgtcactc tccatggca ccatgagcc atctctggc 480
 ttccagccc agatgaca ccaaaaagg cctccgctt ccttgggtt ccagcttgt 540
 ggtcccatg actctgcgc ggtgggtg atcccaac ctctgtcgc gggaccttc 600
 ccacttgc agctgaagc tgcagggc atgtgttg gcagtgcc gagggaacc 660
 ttggaggtg atgtctcg cccactcc acaggtatc aggtccctt gttgggtg 720
 ctgtgtggc gggagatc ccagagagc gagaagcgt agctgaatc tgtgtatg 780
 acagctgc gtggagtc ctgcagtc gatttgcct cccagagca gctgtgac 840
 cactacac ccagacat ccaggggag cggagaggt tctgtgca ctggagggc 900
 tgcctaggc agctgggc ctccaaagc cagtacatc tgggtgta ctgtgcagc 960
 cactctgc agagccaca ccagtcagc ttggaggtt ggcgaagtc atctcagc 1020
 ctgcaaac tggagagca cctgggtca ccaagggc agagccata ctgtgtgag 1080
 cagggggtt gctgaagc ctccagaa gccagtgc ggcagagca ccagatgc 1140
 accatcca atgagagc gtatgtat agctcctg gctcaccac aggtatgc 1200
 gactatgt cgtgagaa acatgtcag atgtgtgt gtctcagc ccatgtgc 1260
 aagggggc gtgggtgt cccctgctt cgggcacat ccttctac agtgagccc 1320
 aagggggc gggagggc tccatcagc gaggaaagc gactgctgt gccagaggt 1380
 gcatgaag ccagccag cctggggc cgtctcctt gcagagga ccctccgc 1440
 gcaggggtg ccgcaatc agcaggtgt gtggatga ctggcagc aggggggc 1500
 actgaagc tctcagct ggcagagc cttgcatg ctggcagc tctctac 1560
 ctgcagc ttgagact cagctgac cagctatc aactcggc aatgggac 1620
 cgggtctca actgcacg ctgtccac ccgggaca ctgtctcc ccgtgtgc 1680
 cccctgtc ctctgagc ccgagcag agctcagc gcacagct tgcctact 1740
 gtccagc gctctcct ggtctcct ttccctct gctccccc agagaatgc 1800
 gactctcc tgcctggct tatgctgc cagcactc tgcctggc agaatgt 1860
 tcagccagc ggtgtgtc ttgcctcc gacatcca gctggatg gtaggtgt 1920
 ctccatgc ctctgtgc aagccagc gattatcc gatcaacc caatgcagc 1980
 gtccagga ggcaggtg ccagccag gctgtgac gtctgtct agctagatc 2040
 cagaggtc agagctgg ctgtctat cccaccca ctgtggagc gggagagc 2100

81

82

aactlilgto etlaentecr naactetgic lacteacunc agccccccag caicacigag 2160
 aatgicgcca tggatgctag agggctacag gaggagcag aagtigggac etccatggig 2220
 ggagtggtic lgaaccccia latggacttc ccaactacig atacticggg atatggagga 2280
 ccigaggggg cagcagctga gcttatgga gogaggggic caggtctct gctctiggg 2340
 ccigtccac ccaccaacta iggcocnuc cccigtccc agcaggcto atatctgac 2400
 cccatccag naactgggg igtgttccct tccactcig ggcigtccc aggcocnuc 2460
 gcctagggg gaactacag ccagtgtct cagcttgac atatggac agtgcagtc 2520
 aggcagaaa aggggtccc agtgggtct gactacacag gaciggcacc ctgcctaat 2580
 gccaccccc gtggggggc cccacatcca cagctctct ttaccatla ccccagccc 2640
 tctccccc aatctctca gtccggccc tatccacgc caccocctga ttaetctct 2700
 tngaaccca ggoolgcci ggcattgat tccccacc ccacacagg gcagctcaag 2760
 gctagcttg tgtatatta tcttctct caacgggagc tactgigga agtggggg 2820
 agggaggg ccctggccc ggaacctcc taccagagc cccagttct ggggggtcc 2880
 caggttgcg caggtcgic taagctcca ggaacacai atggacctg cttgggccc 2940
 aactlgtcca atcagagc aggttccat cccccctt cccatgcca tgaatatti 3000
 gtatggggg caaataggg ttacatagg gcagcagac caccctgact tctgcccc 3060
 tignocactt gctatggcc tctcaggc gaggccaca cccccagct tggctact 3120
 gaggtgggg gctaggagg ggtctgccc ttgacctc cccccagg acaggtatg 3180
 naacccicg actctctga tctgacac actcagcig ccttgggc tctctgct 3240
 ggcocccag gctgagtc tctcttcc cagtacag gggcagtc tgaactac 3300
 cccctccc ctggccccc caactggct gggggaac tgagtgtt actgagtc 3360
 ctactgggg aacagatc cctcaactc agtgcataa gattagggg tctatcat 3420
 cccagatgc atttctag ggtttctat cctccagaa aaatggggg agtgcagtc 3480
 cctgcaca gatgcocag ggaiggagg tatgggtcg ggcctatga tagctctat 3540
 agtltttag gagaatttg ataatgac igtctctga taataagga ccgctcag 3600

<219> 13

<211> 1106

<212> PRT

<213> Human

<400> 13

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro

1 5 10 15

Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr

20 25 30

Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser

35 40 45

Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Glu Thr Asn Ser Cys Thr Glu

50 55 60

Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys

65 70 75 80

Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln

85 90 95

Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser

100 105 110

Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr

115 120 125

Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly

130 135 140

Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala

83				84
145	150	155	160	
Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr				
	165	170	175	
Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu				
	180	185	190	
Glu Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Gln				
	195	200	205	
Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Glu Arg Glu				
	210	215	220	
Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Glu Thr Asp Cys Arg Trp Asp				
	225	230	235	240
Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Glu Glu Gln Leu Val His His Ile				
	245	250	255	
Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp				
	260	265	270	
Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu				
	275	280	285	
Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr				
	290	295	300	
Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr				
	305	310	315	320
His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Gln His Glu				
	325	330	335	
Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Glu				
	340	345	350	
Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly				
	355	360	365	
Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys				
	370	375	380	
Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp				
	385	390	395	400
Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg				
	405	410	415	
Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro				
	420	425	430	
Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Glu Ser Ser Cys				
	435	440	445	
Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly				
	450	455	460	
Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser				
	465	470	475	480
Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg				
	485	490	495	
Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Glu Leu Arg Pro Ile				
	500	505	510	
Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr				
	515	520	525	
Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser				

<div></div> 85	<div></div> 530	<div></div> 535	<div></div> 540
Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser 545 550 555 560	Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser 565 570 575	Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg 580 585 590	Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser 595 600 605
Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala 610 615 620	Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser 625 630 635 640	Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg 645 650 655	Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly 660 665 670
Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln 675 680 685	Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln 690 695 700	Gla Gla Pro Glu Val Gly Thr Ser Met Val Gly Ser Gly Leu Asn Pro 705 710 715 720	Tyr Met Asp Phe Pro Pro Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Glu 725 730 735
Gly Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu Pro 740 745 750	Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Asn Pro Cys Pro Gln 755 760 765	Gln Ala Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Glu Thr Trp Gly Glu Phe Pro 770 775 780	Ser His Ser Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Lys Ala Leu Gly Gly Thr Tyr 785 790 795 800
Ser Gln Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys Pro 805 810 815	Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro Cys 820 825 830	Leu Asn Ala His Pro Ser Glu Gly Pro Pro His Pro Gln Pro Leu Phe 835 840 845	Ser His Tyr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Gln Ser Gly Pro 850 855 860
Tyr Thr Gln Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Pro Ser Glu Pro Arg Pro Cys 865 870 875 880	Leu Asp Phe Ala Ser Pro Thr His Ser Thr Gly Gln Leu Lys Ala Gln 885 890 895	Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Gln Gln Glu Leu Leu Trp Glu Gly 900 905 910	Gly Gly Arg Glu Asp Ala Pro Ala Gln Glu Pro Ser Tyr Gln Ser Pro 915 920 925

87

88

Lys Phe Leu Gly Gly Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960
 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990

Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asp Leu Asp Asn Thr Gln Leu Asp Phe Val Ala Ile Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Glu Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100

Ser Ala

1105

<210> 14

<211> 3600

<212> DNA

<213> Human

<400> 14

ccagacatcc agcccgagcc aggcacatcc gagccacagc ccagacaga gtgcacccac 60
 accctctctat gagagcccat gttcaactcg atgacccccc caccacacag tagcatatgc 120
 gagccctgat gttccggccc cctcccagc caggggcccc ccagtgtggg gacagagga 180
 ctgtctggcc cgcctttctg cccacacagc accctcatgt cgggccccca cagtatggg 240
 ccagccagag agacacacag ctgcacagag ggcacactct ttctctctcc caggagtcca 300
 gtccagtga ccagagagcg ggcctgttcc atctcaccct tctcggatgc cagcccgacc 360
 ctgcagagcg ttatcagcac ctccaccagc tccctcttag ctctaccaa ctgcgatgc 420
 acatctccag gaggtctcta cgttctctc tcccttggca ccatggccc ctctctgga 480
 ttcccagccc agatgaatca cccaaaaggg cctctgcctt ccttggggtt ccagccctgt 540
 ggctcccaig acctctcccg ggttgggttg atccacatc ctccgtccc ggaacccctc 600
 ccaacttgc agtgaagtc tggcgggccc atgtctgttg gcaagtcag gaggagcccc 660
 ttggagggcg atgtctcag ccccaactcc acagggatcc aggtccctct gtggggag 720
 ctggtgggc ggggggacct ccagagagcg gagaagcgig agctgaatc tgtgtatga 780
 actgaatgcc gtgggtgttg ctgcagccag gaatttgaat cccagagaca gctgggtgac 840
 caatcaca ggcagacat ccacgggagc cggagagagt tctgtgccc ctggggggc 900
 tgtccaggg agctgggccc ctccaggcc cagtcatgc tgggtgttca catgcgcaga 960
 caccctggcg agagacaca caagtcacg ttggaggggt ggcggagtc aactcagc 1020
 ctgagaaac tgaagagca ctggaggtca cacaaggggt agagacata caigtgtgag 1080
 cagaggggt gaggtaagc ctccagaaat gccagtgaac gagccagca ccagatgg 1140

89

90

aaccattcca atgagaagcc gtaigtatgi aagctccctg gctgcacaa angelataca 1200
 gctccatagct cgcigcgaaa acatgtcaag acagtgcalt gicctgaagc ccaigtgacc 1260
 aaagggcacc gtggggatgg cccctcgcc cgggacccat ccattctac agtggagccc 1320
 aagaggagag gggagggagg tccalcagg gggaaagca gactgactgt gccagagggt 1380
 gccatgaagc cacagccang cctggggcc cagtcctct gcagcagiga cactccccc 1440
 gcaggagagc cagcaatcc agacagtggt gtggaaatga ctggcaatgc agggagcagc 1500
 acigangacc tcicagctt ggcagaggga ccttgcattt ctggcaatgc tcigtccact 1560
 cttegcgcgc ttgagaacct cagcttgagc cagctacat aactccggcc antagggacc 1620
 cgggagctca aactgcccag ctgtgcccac accggtacaa ctgtgtcccg ccggcggggc 1680
 cccccagctt ctcttgagcg ccgcagcagc agctccagca gcctcagctc tgcctatct 1740
 gtcagccgac gctcctccct ggctctctct ttcccccctg gctccacaa agagaaigga 1800
 gctctctccc tgcctggcct taigccigcc cagcaatcc tgcctcgggc aagataigt 1860
 tgcgcagagc agggagtagc ttgcctcact gcagcaacca gctggatcg gatagtggt 1920
 ctccctatgc ctccctggag aagcagagcc gactatccag gctacacccc caaigcaggg 1980
 gtaaccagga gggccagtga cccagcccg gcigtgacc gicctgctcc agctagagtc 2040
 cagaggttca agagccctgg ctgtgtccat acccaccac ctgtgtcagg gggagggagc 2100
 aacttgatc ctacccctcc aactctgtc tactacacac agcccccag cactactgag 2160
 aatgtgcca tggatgctag agggctatag gaagagccag aagltgggac ctccatggg 2220
 agcagtggtc tgaacccctc taigcacttc ccacccactg atactctggc atatggggga 2280
 cctgaagggg cagcagctga gcttatgga gggaggggtc cagcctctoi ggccttggg 2340
 ccigtccac ccaccaacta tggccccaac cctgtccac agcaggcttc atactgac 2400
 cccaccagc aaacagggg tggatcccti tccactctg ggcgtgacc agcccccag 2460
 gctatagggt gacccatag ccagtgtct cgcctgaaac attatggaca agtgcagtc 2520
 aagcagaaac aggggtgccc agtgggtct gactccacag gactggccc ctgctcaat 2580
 gccaccacca gtgaggggac cccacccca cagctctcti ttccacta cccccagccc 2640
 tctccccc antatctcca gtcaggccc taccaccag caccactga ttatctcti 2700
 tgcgaacca ggccttgctt ggccttgcct tcccccac ctccacagc ggcctcag 2760
 gctcagctt gtgtatcta gtctaatct caccagagc tactgtggc ggttggggc 2820
 agggagagc ccccgctcc ggcactctc taccagagc ccaagtctt gggaggttc 2880
 caggttgc cagcagagc taagctcca gtaaacat atggacagc ctgtgacc 2940
 aacttgcca atcaggagc aggttctat cccaccccti cactatgca tgaatatt 3000
 gtgttgggg caaatgggc ttacatagg ggcagagac cactctgact tcgtcccca 3060
 ttgtcacti gctatggca tctcaagtg ggggcacaa acccagctg tggctacti 3120
 ggggtggca ggtaggagc ggtctgtcc tttaccctc ctcgcagc aggggtatgt 3180
 aacccctgg actctctga tctgacac acatagctg accttggtc tctctggt 3240
 aggcaccagc ggtgagtc tctctctc cagtcagc ggggcagctc tggacatcc 3300
 cccctcccti ctggccccc cactgtgtt ggggcaaca tgggtctcti acagagatc 3360
 ctactgggg aacagaaat cctacacti agtgcclaaa ggttgggaa tctctctat 3420
 cagagatgc atttctagc aggttctat ccttcagac aatggggg agctcagtc 3480
 cctgcacaa gctgcacag ggttgggagc tatggctgg ggcctatga tagctgtat 3540
 acgttttagc gagaatttg aatagacac ttttctga taataagga actgcacag 3600

<210> 15

<211> 1106

<212> PRT

<213> Human

<400> 15

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro

1 5 10 15

Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Glu Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr

20 25 30

91																	
Glu	Gly	Leu	Ser	Gly	Pro	Pro	Phe	Cys	His	Gln	Ala	Asn	Leu	Met	Ser		
		35					40					45					
Gly	Pro	His	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ala	Arg	Glu	Thr	Asn	Ser	Cys	Thr	Glu		
	50					55					60						
Gly	Pro	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Lys		
	65					70				75					80		
Arg	Ala	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Gln		
			85						90						95		
Thr	Val	Ile	Arg	Thr	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Val	Ala	Phe	Ile	Asn	Ser		
		100						105					110				
Arg	Cys	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Gly	His	Leu	Ser	Ile	Gly	Thr		
	115							120					125				
Met	Ser	Pro	Ser	Leu	Gly	Phe	Pro	Ala	Gln	Met	Asn	His	Gln	Lys	Gly		
	130					135					140						
Pro	Ser	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Gln	Pro	Cys	Gly	Pro	His	Asp	Ser	Ala		
	145				150					155					160		
Arg	Gly	Gly	Met	Ile	Pro	His	Pro	Gln	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe	Pro	Thr		
				165					170					175			
Cys	Gln	Leu	Lys	Ser	Glu	Leu	Asp	Met	Leu	Val	Gly	Lys	Cys	Arg	Glu		
		180						185					190				
Glu	Pro	Leu	Gln	Gly	Asp	Met	Ser	Ser	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Ile	Gln		
	195						200				205						
Asp	Pro	Leu	Leu	Gly	Met	Leu	Asp	Gly	Arg	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Glu		
	210					215					220						
Glu	Lys	Arg	Glu	Pro	Gln	Ser	Val	Tyr	Glu	Thr	Asp	Cys	Arg	Trp	Asp		
	225				230					235					240		
Gly	Cys	Ser	Gln	Glu	Phe	Asp	Ser	Gln	Glu	Gln	Leu	Val	His	His	Ile		
			245						250					255			
Asn	Ser	Glu	His	Ile	His	Gly	Glu	Arg	Lys	Glu	Phe	Val	Cys	His	Trp		
		260						265					270				
Gly	Gly	Cys	Ser	Arg	Glu	Leu	Arg	Pro	Phe	Lys	Ala	Gln	Tyr	Met	Leu		
		275						280					285				
Val	Val	His	Met	Arg	Arg	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	His	Lys	Cys	Thr		
	290					295					300						
Phe	Glu	Gly	Cys	Arg	Lys	Ser	Tyr	Ser	Arg	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr		
	305				310					315					320		
His	Leu	Arg	Ser	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Met	Cys	Gln	His	Glu		
				325					330				335				
Gly	Cys	Ser	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Arg	Ala	Lys	His	Gln		

93

94

Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro
 420 425 430
 Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys
 435 440 445
 Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly
 450 455 460
 Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg
 485 490 495
 Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Gln Leu His Gln Leu Arg Pro Ile
 500 505 510
 Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr
 515 520 525
 Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser
 530 535 540
 Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser
 565 570 575
 Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg
 580 585 590
 Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser
 595 600 605
 Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala
 610 615 620
 Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser
 625 630 635 640
 Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg
 645 650 655
 Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln
 675 680 685
 Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln
 690 695 700
 Glu Glu Pro Gln Val Gly Thr Ser Met Val Gly Ser Gly Leu Asn Pro
 705 710 715 720
 Tyr Met Asp Phe Pro Pro Thr Asp Thr Leu Gly Tyr Gly Gly Pro Glu
 725 730 735
 Gly Ala Ala Ala Glu Pro Tyr Gly Ala Arg Gly Pro Gly Ser Leu Pro
 740 745 750
 Leu Gly Pro Gly Pro Pro Thr Asn Tyr Gly Pro Asn Pro Cys Pro Gln
 755 760 765
 Gln Ala Ser Tyr Pro Asp Pro Thr Gln Gln Thr Trp Gly Glu Phe Pro
 770 775 780
 Ser His Ser Gly Leu Tyr Pro Gly Pro Lys Ala Leu Gly Gly Thr Tyr
 785 790 795 800
 Ser Gln Cys Pro Arg Leu Glu His Tyr Gly Gln Val Gln Val Lys Pro

95

96

805 810 815
 Glu Gln Gly Cys Pro Val Gly Ser Asp Ser Thr Gly Leu Ala Pro Cys
 820 825 830
 Leu Asn Ala His Pro Ser Gln Gly Pro Pro His Pro Gln Pro Leu Phe
 835 840 845
 Ser His Tyr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gln Tyr Leu Gln Ser Gly Pro
 850 855 860
 Tyr Thr Gln Pro Pro Pro Asp Tyr Leu Pro Ser Glu Pro Arg Pro Cys
 865 870 875 880

Leu Asp Phe Asp Ser Pro Thr His Ser Thr Gly Gln Leu Lys Ala Gln
 885 890 895
 Leu Val Cys Asn Tyr Val Gln Ser Gln Gln Gln Leu Leu Trp Glu Gly
 900 905 910
 Gly Gly Arg Glu Asp Ala Pro Ala Gln Glu Pro Ser Tyr Gln Ser Pro
 915 920 925
 Lys Phe Leu Gly Glu Ser Gln Val Ser Pro Ser Arg Ala Lys Ala Pro
 930 935 940
 Val Asn Thr Tyr Gly Pro Gly Phe Gly Pro Asn Leu Pro Asn His Lys
 945 950 955 960
 Ser Gly Ser Tyr Pro Thr Pro Ser Pro Cys His Glu Asn Phe Val Val
 965 970 975
 Gly Ala Asn Arg Ala Ser His Arg Ala Ala Ala Pro Pro Arg Leu Leu
 980 985 990
 Pro Pro Leu Pro Thr Cys Tyr Gly Pro Leu Lys Val Gly Gly Thr Asn
 995 1000 1005
 Pro Ser Cys Gly His Pro Glu Val Gly Arg Leu Gly Gly Gly Pro Ala
 1010 1015 1020
 Leu Tyr Pro Pro Pro Glu Gly Gln Val Cys Asn Pro Leu Asp Ser Leu
 1025 1030 1035 1040
 Asp Leu Asp Asn Thr Glu Leu Asp Phe Val Ala His Leu Asp Glu Pro
 1045 1050 1055
 Gln Gly Leu Ser Pro Pro Pro Ser His Asp Gln Arg Gly Ser Ser Gly
 1060 1065 1070
 His Thr Pro Pro Pro Ser Gly Pro Pro Asn Met Ala Val Gly Asn Met
 1075 1080 1085
 Ser Val Leu Leu Arg Ser Leu Pro Gly Glu Thr Glu Phe Leu Asn Ser
 1090 1095 1100

Ser Ala

1105

<210> 16

<211> 3600

<212> DNA

<213> Human

<400> 16

ccagacacac agccctggac agccatccc gagccagag ccagacaga gtgtccccc 60
 accctctctt gagagccat gtcaactcg atgaccccac caccnalcag tgcctatggc 120
 gagccctgtc gtctcgggc cctcccagc cagggggccc ccagtgtggg gacagagga 180
 ctgtctggcc cgccttcig ccannagct aactctatgt cgggccecc cagttaiggg 240
 ccagccagag agaccacag ctgcacagag ggcccactct ttctctctcc caggagcca 300

gicaggtga ccaagagagc ggcattgic aicacaccc tctcggatgc cagcctggac 360
 cagcagaggg iatcrggac ctcaccagc tccctcgtag cttccatcna ctcgrgagc 420
 acatctccag gaggcccta aggcacac cccattggca ccatgagccc atcctcggga 480
 ttcacagccc agatgaatc ccaaaaagg cccctcgctt cctttggagt ccagcctgt 540
 ggtcccaatg acctcgcgcg ggttggatg atccacac ctcagtcgcg gggcccttc 600
 ccaacttgc agcagagta tgaatggac aiccttggtt gcaagtgcg gagggaacc 660
 ttggaagtg atagtccag ccccaacac aacggcatac aggatccctt gttgggag 720
 ctggttggc gggaggaact cagagagag gagaagcgt agcctgaac tgtgatga 780
 acagacgac gttgggagtg ctgagccag gaattgact cccagagca gttggtgac 840
 caccatcaca ggaagcact cccggggag cggagaggt tctgtgca ctggggagg 900
 tgcctcagg agctgagac cttcaaac caglacatg tggctggta cctgcgaga 960
 ccaacttggc agagccaca cagtgacg tttagaggtt gcccgaagt atactacg 1020
 ctgcaaac tgaagacga cctgggta caccgggtt agagccata cctgtgtg 1080
 cagcaggtt gcagtgaac ctacagcat gccagtgac gacacagca ccagatcgg 1140
 accatcna atgagagac gtagttagt aagctccctt gctgaccaa ccgtatca 1200
 gactctagt cgtcgagaa acatgtcag acagtgatg gtcctgcg ccatgtgac 1260
 aaacggcac gttgggagtg cccctgcct cgggacat ccatcttac agtggagcc 1320
 agagagagc gggagggag tccatcag gaggagga gactgactt gcccaggtt 1380
 gccaagga caccgcaag cctggggc cagctccctt gacagagga cactcccg 1440
 gcagggagt cagccatac agcagtggt gtagaatg ctggcaatg agggggcag 1500
 actgaagac tctcagctt gacgagga cctgcattg ctggcattg tctgctact 1560
 ctctgcgc ttgagaccc cagctggac cagctacac aactccgac atagggac 1620
 cgggtctca aactgccag ctgtgccc accggtaca ctgtctccg cagctggc 1680
 cccacagct ccttgacg cccagagc agctccag gactcagtc tgcctact 1740
 gtcagccgc gctctccct ggtctctct ttcctccg gctccccc agagatga 1800
 gactctcc tgcctggct tctgctgc cagcctacc tctctgggc agatctgt 1860
 tccgagagc ggggtgtat tctgcccct gacacatca gctggatg gataggtgt 1920
 ctccctgc cctctggac aagcagac gactatcag gataaccc caatgcagg 1980
 gtcacagga gggcagga cccagccag gctgcgac gctctgctt agctagatc 2040
 cagaggtca agagcctag ctgtgctat accccacca ctgtggcag gggagagc 2100
 aacttgatc ctctccac aacctgtc tctcaccac agcccccag cactcctg 2160
 aactgtca tggatgtag aggcctac gaggagccag aacttggac ctcctgtg 2220
 ggcagtggt tgaaccca tctgacac caccctac atactctgg atctgggga 2280
 ctgagagag cagcagcga gctctgga gggggggt cagctctct gctctggg 2340
 cctgtgac cccaccca tggcccaac cctgtgac agcagccca atactgac 2400
 ccccccag aacacaggg tgaattcc tccctctg gctgtacc aggcacag 2460
 gctctagtg gacccacg cagctgctt cacttgac attagagca agtgacatc 2520
 aagccagac aggggtgct agtggggt gactccag gactggac ctgctcaat 2580
 gcccccna gtaggggc cccaccca cagctctct ttcctatc cccagccc 2640
 tctctccc atctctca gtcagccc taccacag cccccga ttactctt 2700
 tccagacca gctctgctt gactgtgt tcccccac atccacag gactcag 2760
 gctcagctt gctgtatc tctcaatc caccagag tctgtgga gctgggga 2820
 agggagag cccagccc ggaacccc taccagatc ccaattctt ggggattcc 2880
 caggttgc cagcctgtc taagctca gtagacat atggacctt cttggacc 2940
 aactgccc atccagatc aggtctat ccccccctt cccatgca tgaatttt 3000
 gtagtgggg caattaggg tccatagg gacagagac cactcagct tctgcccc 3060
 ttgcccctt gctatgggc tctcaagt gtaggaca acccagctt tggctctt 3120
 gaggaggca gctagggg ggtctgct tctgacct cccagagg accgttgt 3180
 aacccctg acctctga tctgacac actcagctt acttgggc tctctgtt 3240
 ggcctcag gctgagtc tctctctc cctgacag gggcagct tggacata 3300

99

100

ccccctccct cgggcccccc caccatggtt gggggcaaca tgaagtgiott actgagatcc 3360
 ctacttgggg aaccagaatt cctcaactct agtgcctaaa gagiagggaa tctcatccat 3420
 caccagatgc attlccctaa gggtttctat ccttcacaaa aaattgggga agctgcagtc 3480
 cccctgcaca gaigccccag gcatgggagg tatgggctgg ggctatgla tagtcigtat 3540
 acgttttgag gagaatttg aiaatgaenc tgttctctga taataaagga acigcctcag 3600

<210> 17

<211> 1046

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

Met Phe Asn Ser Met Thr Pro Pro Pro Ile Ser Ser Tyr Gly Glu Pro
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Arg Pro Leu Pro Ser Gln Gly Ala Pro Ser Val Gly Thr
 20 25 30
 Glu Gly Leu Ser Gly Pro Pro Phe Cys His Gln Ala Asn Leu Met Ser
 35 40 45
 Gly Pro His Ser Tyr Gly Pro Ala Arg Gln Thr Asn Ser Cys Thr Glu
 50 55 60
 Gly Pro Leu Phe Ser Ser Pro Arg Ser Ala Val Lys Leu Thr Lys Lys
 65 70 75 80
 Arg Ala Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp Ala Ser Leu Asp Leu Gln
 85 90 95
 Thr Val Ile Arg Thr Ser Pro Ser Ser Leu Val Ala Phe Ile Asn Ser
 100 105 110
 Arg Cys Thr Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Gly His Leu Ser Ile Gly Thr
 115 120 125
 Met Ser Pro Ser Leu Gly Phe Pro Ala Gln Met Asn His Gln Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Pro Ser Phe Gly Val Gln Pro Cys Gly Pro His Asp Ser Ala
 145 150 155 160
 Arg Gly Gly Met Ile Pro His Pro Gln Ser Arg Gly Pro Phe Pro Thr
 165 170 175
 Cys Gln Leu Lys Ser Glu Leu Asp Met Leu Val Gly Lys Cys Arg Glu
 180 185 190
 Gln Pro Leu Glu Gly Asp Met Ser Ser Pro Asn Ser Thr Gly Ile Gln
 195 200 205
 Asp Pro Leu Leu Gly Met Leu Asp Gly Arg Glu Asp Leu Gln Arg Glu
 210 215 220
 Glu Lys Arg Glu Pro Glu Ser Val Tyr Gln Thr Asp Cys Arg Trp Asp
 225 230 235 240
 Gly Cys Ser Gln Glu Phe Asp Ser Gln Glu Gln Leu Val His His Ile
 245 250 255
 Asn Ser Glu His Ile His Gly Glu Arg Lys Glu Phe Val Cys His Trp
 260 265 270
 Gly Gly Cys Ser Arg Glu Leu Arg Pro Phe Lys Ala Gln Tyr Met Leu
 275 280 285
 Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys Pro His Lys Cys Thr
 290 295 300
 Phe Glu Gly Cys Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Leu Glu Asn Leu Lys Thr

101				102
305	310	315	320	
His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Met Cys Glu His Glu				
	325	330	335	
Gly Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp Arg Ala Lys His Gln				
	340	345	350	
Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val Cys Lys Leu Pro Gly				
	355	360	365	
Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu Arg Lys His Val Lys				
	370	375	380	
Thr Val His Gly Pro Asp Ala His Val Thr Lys Arg His Arg Gly Asp				
	385	390	395	400
Gly Pro Leu Pro Arg Ala Pro Ser Ile Ser Thr Val Glu Pro Lys Arg				
	405	410	415	
Glu Arg Glu Gly Gly Pro Ile Arg Glu Glu Ser Arg Leu Thr Val Pro				
	420	425	430	
Glu Gly Ala Met Lys Pro Gln Pro Ser Pro Gly Ala Gln Ser Ser Cys				
	435	440	445	
Ser Ser Asp His Ser Pro Ala Gly Ser Ala Ala Asn Thr Asp Ser Gly				
	450	455	460	
Val Glu Met Thr Gly Asn Ala Gly Gly Ser Thr Glu Asp Leu Ser Ser				
	465	470	475	480
Leu Asp Glu Gly Pro Cys Ile Ala Gly Thr Gly Leu Ser Thr Leu Arg				
	485	490	495	
Arg Leu Glu Asn Leu Arg Leu Asp Glu Leu His Gln Leu Arg Pro Ile				
	500	505	510	
Gly Thr Arg Gly Leu Lys Leu Pro Ser Leu Ser His Thr Gly Thr Thr				
	515	520	525	
Val Ser Arg Arg Val Gly Pro Pro Val Ser Leu Glu Arg Arg Ser Ser				
	530	535	540	
Ser Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ala Tyr Thr Val Ser Arg Arg Ser Ser				
	545	550	555	560
Leu Ala Ser Pro Phe Pro Pro Gly Ser Pro Pro Glu Asn Gly Ala Ser				
	565	570	575	
Ser Leu Pro Gly Leu Met Pro Ala Gln His Tyr Leu Leu Arg Ala Arg				
	580	585	590	
Tyr Ala Ser Ala Arg Gly Gly Gly Thr Ser Pro Thr Ala Ala Ser Ser				
	595	600	605	
Leu Asp Arg Ile Gly Gly Leu Pro Met Pro Pro Trp Arg Ser Arg Ala				
	610	615	620	
Glu Tyr Pro Gly Tyr Asn Pro Asn Ala Gly Val Thr Arg Arg Ala Ser				
	625	630	635	640
Asp Pro Ala Gln Ala Ala Asp Arg Pro Ala Pro Ala Arg Val Gln Arg				
	645	650	655	
Phe Lys Ser Leu Gly Cys Val His Thr Pro Pro Thr Val Ala Gly Gly				
	660	665	670	
Gly Gln Asn Phe Asp Pro Tyr Leu Pro Thr Ser Val Tyr Ser Pro Gln				
	675	680	685	
Pro Pro Ser Ile Thr Glu Asn Ala Ala Met Asp Ala Arg Gly Leu Gln				

<210> 18
<211> 3500
<212> RNA
<213> Human

(400) 18

cccagactcc agccctggac cggccatccc gggcccgagg cccagacaga ggtcccccac 60
 accctccctc gaggcccat gttcaactcg atgacccac caccatcag tagctatggc 120
 gggccctgct gtctccggcc cctcccagc caggggccc ccagtgtggg gacagagga 180
 cigtctggcc cggccttcg ccccnagct aactcatgt cggccccc cagitatggg 240
 ccgcccagg agcccaacag ctgcacagag ggcacactc ttcttctcc cggagtga 300
 gtaagttga ccaagagag ggcactgter atctacccc tctcgatgc cagctggac 360
 ctgcagcgg ttatccgac ctcacccagc tccctctag ctctatcaa ctgcagatg 420
 aactctccag gaggctctc cgtctactc tccattggc ccatgagcc aictctggg 480
 ttccagccc agatgacta ccaaaaagg cctctgctc cctttgggt ccagccctg 540
 ggtcccatg actctgccc ggggtggatg atccacatc ctccagccc gggacccctc 600
 ccaacttgc agctgagtc tggctggac agctgtgtg gcaagtcag ggggaaccc 660
 ttgaggggtg ctatgctcag cccatctcc ccaggcaac aggtatccc gtgggggtg 720
 ctggtgggc ggggggac cggagagag ggaagcgtg agctgactc tggatgaa 780
 acgagcgc gtgtgtgtg ctgcagccag gaattgact cccagagca gctgtgac 840
 cactcaaaa gggagccat ccacggggg cggagaggt tctgtgcca ctggggggc 900
 tgcctcagg agctgagcc ctccaaagc cagtacatg tgggtgta cgtgcgaga 960
 cccactggc agaagccac caagtgcag ttgaagggt cccgagagc atactcagc 1020
 ctgcaaac cgaagagcc cctggcgta ccccggtg agaagccac catgtgtg 1080
 cagggggct gaggtaagg ctccagcaat ggcagtccc ggcacagca ccagatgg 1140
 accatctc aagggaagc gtatgtgtg aggtccctg gctgcacaa accatatac 1200
 gactctagt cgtgcgaa aactgtcag ccagtgcag gtcctgagc ccagtgcac 1260
 aacgggccc gtggggatg cccctgctc cgggacccat cctttctac agtggagcc 1320
 aagggggag ggaagggag tccatcagg ggggaagca gactgactg gccagaggt 1380
 gcaatgagc cccagccag cctggggcc cagtactct gacagatga ccactccc 1440
 ggggggtg cggcctac agacgtgtg ggggaatga ctggcaatg agggggagc 1500
 actgaagcc tctcagctt ggaagggga cctgcatg ctggcctg tctctact 1560
 ctccagccc ttgagaccc caggctggc cagctatcc aactcggc aatagggac 1620
 cgggtctca aactgcacg ctgtccac accgtaaca ctgttccc ccgtggagc 1680
 cccatgct ccttgaaag ccgcagcag apctccaga gctccgctc tgcataact 1740
 gtcagccgc gctctctt ggcctctct tcccccctg gctccccc agagatgga 1800
 gcatctcc tgcctggct tatgctgac cagcactac tctctgggc agaatgtc 1860
 tccgacag ggggtgttc ttgcctact gacgctcc cctggatg gataggtgt 1920
 ctcccatg cctctggg aggtgggac gactatccg gatacaacc cctgaggg 1980
 gtcacccga ggcacgtg cccagcccag gtgcagac gtcctgctc agctagatc 2040
 cagaggttca agagctggg ctgttccat acccaccac ctgtggcag gggagagag 2100
 aacttgac ctaccctcc aactctgtc tactaccac agccccccag caicactgag 2160
 aagtgcac tggatgtag aggtacac gaaagcccag aagtgggac ctcatgtgtg 2220
 agcagtgtc tgaacccca tatggactt cccctacg atactctgg atatggaga 2280
 cctgaaggg cagcagcag gcttatga ggaagggc cagctctct gctctggg 2340
 cctgtccc cccacacta tggccccc cctgtccc agcagctcc atctctgac 2400
 cccacccag aactatggg tgaatctct tccactct gctgtacc agccccag 2460
 gctctggg gacatcac ccagtgtct cgaclggac atatggaa agtgcagtc 2520
 aagccagac aggggtccc agtgggtct gactccag gacgggac ctgcctaat 2580
 gcccaccc gtgggggccc cccacatca cagctctct ttccacta ccccgagcc 2640
 tctctccc aatctctca gtcaggccc tatcccag ccccccga ttactctc 2700
 tccgaaccc agcctgtct ggaactgat tccccccc atccacag gacgtcag 2760
 gctcagctt tggtaatc tctcaatc caccagagc tactgtgga ggtgggagc 2820
 aggaaggt ccccgccc ggaacttcc taccagag ccaagtctc ggggggtcc 2880
 caggctagc cagcagtc taaactcca gggacacat atggacgtg cttggagcc 2940

107

108

aacitggcca atcacaagtc aggttccat eccacccctt cccatggcca tggaaatttt 3060
 gtagtggggg caaafagggg ttaaatagg gcagcagcac cccctggact tctgcccca 3060
 ttgccactt gataaggcc telcaagtg gaggcacaa accccagctg tggcatact 3120
 gagtgggca ggtaggagg ggghctgcn tigtacctc ctcccgaag acaggtatgt 3180
 aacccctgg atctcttga tcttgcaaa acicagctgg atttgttgc tatctggat 3240
 gagccccagg ggtgagtc tctctctca caigtcagc gggcagctc tggactaac 3300
 cccctccct ctggccccc caaatggct ggggcaaa igugtgtct atgagctcc 3360
 ctactgggg aaacaaatt cctcaactct agtgcctaaa gattagggaa tctctccat 3420
 caagatgcc atctctaa ggtttttat ctctcagaa aaattgggg agctcagtc 3480
 ccttgcaaa gatgccccg ggtgggagg tatggcttg ggctatgta tagtctgtat 3540
 agttttgg gagaaattg ataagcac tgttctga taataagga actgcatag 3600

<210> 19

<211> 1596

<212> PKT

<213> Mouse

<400> 19

Met	Glu	Ala	Glu	Ala	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala
1				5						10				15	
Glu	Asn	Ser	Ile	Gly	Lys	Cys	Pro	Thr	Arg	Thr	Asp	Val	Ser	Glu	Lys
				20					25					30	
Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Asn	Glu	Asp	Glu	Ser	Pro	Gly	Glu
				35				40						45	
Ile	Tyr	His	Arg	Glu	Arg	Arg	Asn	Ala	Ile	Thr	Met	Glu	Pro	Gln	Ser
				50				55					60		
Val	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Ile	Ser	Glu	Glu	Pro	Ser	Thr	Ser	Ser	Asp
				65				70					75		80
Glu	Arg	Ala	Ser	Leu	Ile	Lys	Lys	Glu	Ile	His	Gly	Ser	Leu	Pro	His
				85				90						95	
Leu	Ala	Glu	Pro	Ser	Leu	Pro	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Phe	Ala	Met	Asp
				100				105						110	
Pro	Arg	Asn	Gly	Tyr	Met	Glu	Pro	His	Tyr	His	Pro	Pro	His	Leu	Phe
				115				120						125	
Pro	Ala	Phe	His	Pro	Pro	Val	Pro	Ile	Asp	Ala	Arg	His	His	Glu	Gly
				130				135						140	
Arg	Tyr	His	Tyr	Asp	Pro	Ser	Pro	Ile	Pro	Pro	Leu	His	Val	Pro	Ser
				145				150						155	160
Ala	Leu	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Tyr	Pro	Asp	Leu	Pro	Phe	Ile	Arg	Ile
				165				170						175	
Ser	Pro	His	Arg	Asn	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Pro	Phe	Ser	Pro
				180				185						190	
Pro	His	Pro	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Met	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Leu	His
				195				200						205	
Cys	Ser	Pro	Ser	Leu	Ser	Met	Ile	Ser	Ala	Ala	Arg	Gly	Leu	Ser	Pro
				210				215						220	
Thr	Asp	Ala	Pro	His	Ala	Gly	Val	Ser	Pro	Ala	Glu	Tyr	Tyr	His	Gln
				225				230						235	240
Met	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ala	Asp	Ile	Leu	Pro
				245				250						255	
Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ile	His	Met	Glu	Tyr	Leu	His

109

110

	260	265	270
Ala Met Asp Ser Thr Arg Phe Pro Ser Pro Arg Leu Ser Ala Arg Pro			
275	280	285	
Ser Arg Lys Arg Thr Leu Ser Ile Ser Pro Leu Ser Asp His Ser Phe			
290	295	300	
Asp Leu Gln Thr Met Ile Arg Thr Ser Pro Asn Ser Leu Val Thr Ile			
305	310	315	320
Leu Asn Asn Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ala Ser Gly Ser Tyr Gly His			
325	330	335	
Leu Ser Ala Ser Ala Ile Ser Pro Ala Leu Ser Phe Thr Tyr Pro Ser			
340	345	350	
Ala Pro Val Ser Leu His Met His Gln Gln Ile Leu Ser Arg Gln Gln			
355	360	365	
Ser Leu Gly Ser Ala Phe Gly His Ser Pro Pro Leu Ile His Pro Ala			
370	375	380	
Pro Thr Phe Pro Thr Gln Arg Pro Ile Pro Gly Ile Pro Thr Val Leu			
385	390	395	400
Asn Pro Val Gln Val Ser Ser Gly Pro Ser Gln Ser Ser Gln Ser Lys			
405	410	415	
Pro Thr Ser Glu Ser Ala Val Ser Ser Thr Gly Gly Pro Met His Asn			
420	425	430	
Lys Arg Ser Lys Ile Lys Pro Asp Glu Asp Leu Pro Ser Pro Gly Ser			
435	440	445	
Arg Gly Gln Gln Gln Gln Pro Glu Gly Thr Thr Leu Val Lys Glu Glu			
450	455	460	
Ala Asp Lys Asp Glu Ser Lys Gln Glu Pro Gln Val Ile Tyr Glu Thr			
465	470	475	480
Asn Cys His Trp Glu Gly Cys Thr Arg Glu Phe Asp Thr Gln Asp Gln			
485	490	495	
Leu Val His His Ile Asn Asn Asp His Ile His Gly Glu Lys Lys Glu			
500	505	510	
Phe Val Cys Arg Trp Leu Asp Cys Ser Arg Glu Gln Lys Pro Phe Lys			
515	520	525	
Ala Gln Tyr Met Leu Val Val His Met Arg Arg His Thr Gly Glu Lys			
530	535	540	
Pro His Lys Cys Thr Phe Glu Gly Cys Thr Lys Ala Tyr Ser Arg Leu			
545	550	555	560
Gln Asn Leu Lys Thr His Leu Arg Ser His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr			
565	570	575	
Val Cys Glu His Glu Gly Cys Asn Lys Ala Phe Ser Asn Ala Ser Asp			
580	585	590	
Arg Ala Lys His Gln Asn Arg Thr His Ser Asn Glu Lys Pro Tyr Val			
595	600	605	
Cys Lys Ile Pro Gly Cys Thr Lys Arg Tyr Thr Asp Pro Ser Ser Leu			
610	615	620	
Arg Lys His Val Lys Thr Val His Gly Pro Glu Ala His Val Thr Lys			
625	630	635	640
Lys Gln Arg Gly Asp Met His Pro Arg Pro Pro Pro Arg Asp Ser			
645	650	655	

111

112

Gly Ser His Ser Gln Ser Arg Ser Pro Gly Arg Pro Thr Gln Gly Ala
 660 665 670
 Phe Gly Gln Gln Lys Glu Leu Ser Asn Thr Thr Ser Lys Arg Gln Glu
 675 680 685
 Cys Leu Gln Val Lys Thr Val Lys Ala Glu Lys Pro Met Thr Ser Gln
 690 695 700

 Pro Ser Pro Gly Gly Gln Ser Ser Cys Ser Ser Gln Gln Ser Pro Ile
 705 710 715 720
 Ser Asn Tyr Ser Asn Ser Gly Leu Glu Leu Pro Leu Thr Asp Gly Gly
 725 730 735
 Ser Val Ala Asp Leu Ser Ala Ile Asp Glu Thr Pro Ile Met Asp Ser
 740 745 750
 Thr Ile Ser Thr Ala Thr Thr Ala Leu Ala Leu Gln Ala Arg Arg Asn
 755 760 765
 Pro Ala Gly Thr Lys Trp Met Glu His Ile Lys Leu Glu Arg Leu Lys
 770 775 780
 Gln Val Asn Gly Met Phe Pro Arg Leu Asn Pro Ile Leu Pro Ser Lys
 785 790 795 800
 Ala Pro Ala Val Ser Pro Leu Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ser Asn Asn
 805 810 815
 Asn Tyr Ser Ser Gly Gly Pro Gly Thr Leu Leu Pro Ser Arg Ser Asp
 820 825 830
 Leu Ser Gly Val Asp Phe Thr Val Leu Asn Thr Leu Asn Arg Arg Asp
 835 840 845
 Ser Asn Thr Ser Thr Ile Ser Ser Ala Tyr Leu Ser Ser Arg Arg Ser
 850 855 860

 Ser Gly Ile Ser Pro Cys Phe Ser Ser Arg Arg Ser Ser Gln Ala Ser
 865 870 875 880
 Gln Ala Glu Gly Arg Pro Gln Asn Val Ser Val Ala Asp Ser Tyr Asp
 885 890 895
 Pro Ile Ser Thr Asp Ala Ser Arg Arg Ser Ser Gln Ala Ser Gln Gly
 900 905 910
 Asp Gly Leu Pro Ser Leu Leu Ser Leu Thr Pro Val Gln Gln Tyr Ala
 915 920 925
 Leu Lys Ala Lys Tyr Ala Ala Pro Thr Gly Gly Pro Pro Pro Thr Pro
 930 935 940
 Leu Pro His Met Glu Arg Leu Ser Leu Lys Thr Lys Met Ala Leu Leu
 945 950 955 960
 Gly Glu Gly Arg Asp Ser Gly Val Thr Leu Pro Pro Val His Pro Pro
 965 970 975
 Arg Arg Cys Ser Asp Gly Gly Gly His Thr Tyr Arg Gly Arg His Leu
 980 985 990
 Met Pro His Asp Ala Leu Ala Asn Ser Val Arg Arg Asp Ser Asp Pro
 995 1000 1005
 Val Arg Thr Val Ser Glu Asn Met Ser Leu Ala Arg Val Gln Arg Phe
 1010 1015 1020
 Ser Ser Leu Asn Ser Phe Asn Pro Pro Asn Leu Pro Pro Ser Val Glu
 1025 1030 1035 1040

113
 Lys Arg Ser Leu Val Leu Gln Asn Tyr Thr Arg Gln Gln Ser Ser Gln
 1045 1050 1055
 Pro Arg Tyr Phe Gln Ala Ser Pro Cys Pro Pro Ser Ile Thr Gln Asn
 1060 1065 1070
 Val Ala Leu Gln Ala Leu Thr Met Asp Ala Asp Ala Asn Leu Asn Asp
 1075 1080 1085
 Gln Asp Leu Leu Pro Asp Asp Val Val Gln Tyr Leu Asn Ser Gln Asn
 1090 1095 1100
 Gln Thr Gly Tyr Gly Gln Gln Leu Gln Ser Gly Ile Ser Gln Asp Ser
 1105 1110 1115 1120
 Lys Val Ala His Gln Pro Gln Asp Leu Asp Leu Ala Gly Leu Pro Asp
 1125 1130 1135
 Ser His Val Gly Gln Gln Tyr Pro Ala Leu Gln Gln Pro Cys Ser Gln
 1140 1145 1150
 Gly Ser Lys Thr Asp Leu Pro Ile Gln Trp Asn Gln Val Ser Ser Gly
 1155 1160 1165

 Thr Ser Asp Leu Ser Ser Ser Lys Leu Lys Cys Gly Gln Gln Arg Pro
 1170 1175 1180
 Arg Gln Gln Pro Arg Gly Phe Gly Leu Tyr Asn Asn Met Val Val His
 1185 1190 1195 1200
 Pro His Asn Leu Trp Lys Val Gly Thr Gly Pro Ala Gly Gly Tyr Gln
 1205 1210 1215
 Thr Leu Gly Gln Asn Ser Ser Thr Tyr Asn Gly Pro Gln His Phe Ala
 1220 1225 1230
 Ile His Ser Gly Asp Gly Leu Gly Thr Asn Gly Asn Thr Phe His Gln
 1235 1240 1245
 Gln Pro Phe Lys Thr Gln Gln Tyr Gly Ser Gln Leu Asn Arg Gln Pro
 1250 1255 1260
 Leu Thr Ser Ser Ala Leu Asp His Ala Cys Gly Thr Gly Ile Gln Gly
 1265 1270 1275 1280
 Ser Lys Leu Lys Gly Asn Ser Leu Gln Gln Asn Gly Gly Leu Leu Asp
 1285 1290 1295
 Phe Ser Leu Ser Val Ala Pro Asn Gln Leu Ala Gly Asn Thr Val Asn
 1300 1305 1310
 Gly Met Gln Thr Gln Asp Gln Met Gly Gln Gly Tyr Ile Ala His Gln
 1315 1320 1325

 Leu Leu Ser Gly Ser Met Gln His Gln Gly Pro Ser Arg Pro Gly Gln
 1330 1335 1340
 Gln Val Leu Gly Gln Val Gly Ala Thr Ser His Ile Asn Ile Tyr Gln
 1345 1350 1355 1360
 Gly Thr Gln Ser Cys Leu Pro Gly Thr Gln Asp Asn Ser Ser Gln Pro
 1365 1370 1375
 Ser Ser Met Ala Ala Ile Arg Gly Tyr Gln Pro Cys Ala Ser Tyr Gly
 1380 1385 1390
 Gly Asn Arg Arg Gln Ala Met Pro Arg Gly Asn Leu Thr Leu Gln Gln
 1395 1400 1405
 Gly Gln Leu Ser Asp Met Ser Gln Ser Ser Arg Val Asn Ser Ile Lys
 1410 1415 1420

115

116

Met Glu Ala Gln Gly Gln Ser Gln Gln Leu Cys Ser Thr Val Gln Asn
 1425 1430 1435 1440
 Tyr Ser Gly Gln Phe Tyr Asp Gln Thr Met Gly Phe Ser Gln Gln Asp
 1445 1450 1455
 Arg Lys Ala Gly Ser Phe Ser Leu Ser Asp Ala Asn Cys Leu Leu Gln
 1460 1465 1470
 Gly Thr Cys Thr Glu Asn Ser Glu Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gln
 1475 1480 1485
 Val Thr Ser Thr Val Asp Ser Phe Glu Ser His Asp Leu Glu Gly Val
 1490 1495 1500
 Gln Ile Asp Phe Asp Ala Ile Ile Asp Asp Gly Asp His Thr Ser Leu
 1505 1510 1515 1520
 Met Ser Gly Ala Leu Ser Pro Ser Ile Ile Gln Asn Leu Ser His Ser
 1525 1530 1535
 Ser Ser Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Ile Pro
 1540 1545 1550
 Ile His Gly His His Gln His Gly Tyr Arg Gly Tyr Glu Phe Phe Ala
 1555 1560 1565
 Asp Leu Pro Cys Arg Arg Lys Gln Val Pro Cys Ser Tyr Ala Val Gly
 1570 1575 1580
 Gly Arg Gln Gly Gly Pro Gln Thr Gln Arg Leu Lys
 1585 1590 1595

<210> 20

<211> 5113

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 20

caggcaccag ccacaccag ccgcgcggg ccgcaccagg gaccagtcag gccaccacag 60
 gtacccagag tcgcctcag gccgcgcggc ggcgtctgt ggccttggga cctgacagcc 120
 aagccgcag ggcctctt gagaacag ctgaagtaa ggcagacat tatggaggcc 180
 caggccacac gctcaccgc gactgagag aagaagctg aaattccat tgggaattgt 240
 cccacagaa cagctgcag ccgagagcc gtggcctcta gtaccactt caatgaggat 300
 ggcagtcctg gacagatcta tcccgagag aagaagacg caatcactat gcgcctcag 360
 agtgicagc gctcaccac aatcagtcg ggcgcctcga cgtctagtga tgcagagcc 420
 tgcctgata aagaagagat caatggctt ctacacac ccgcggagcc ctctctccct 480
 tccctgggga ctgtgttgc catggatcc cggatggct acatggagcc tccctaccac 540
 cctctctat tttctcgc ctctcact cctgaccac tgcctgcag acatctgag 600
 ggccttacc attatgtc ctctctatt cctcattac agtgctctt tgccttctt 660
 cgtagccga cgtatccag ctgccttcc attaggtat cccacaccc taatccact 720
 ggcgcctcag agtccctt cagccccc caccctaca tcaaccata tatggactac 780
 atcgcctat tgcctgcag cccctccc tccatgata ctgtgcctg aggcctgag 840
 cctacagatg ctcccatgc tggagtcag cctgrrgaat actatccca gatgctctg 900
 ctgacagcc aggcagccc ttatgagac atcttccct cagctgccc tgcctgtgca 960
 ggcgcctcc attgagta ccttcctgc atggacaga ccagattcc cagccctagg 1020
 ctgicagca ggcctagcc aaacgtaga ctgtcctat cgcactgtc agctcagc 1080
 ttgcacctt agacatgat aagaacatc cctacctct tggtaaat ctctataat 1140
 tcccgtagca gctctcagc agtggttcc tatgggacat taicggcaag tgcactcag 1200
 cctgcatga gcttaccia cccctccgt cctgtgtct ttcacatga tcaacagac 1260
 ctacgcagc agcaagcct aggtccgga ttggacaca gccctccct catccacct 1320
 gctccacat ttcacaca gagaatcc cctgggatt ccacattct gacccctg 1380

117

118

caggicagct ctggcccttc tgagictca cagagcaagc ccacaagaga gtctgcagtg 1440
 agcagacccg gtggccctat gcataaang eggtccaga tcaagctga tgaagaccic 1500
 ccagccccag ggtccggggt ccagcaggga cagccggaag gaacacccct agtccaggag 1560
 gaagcggaca agatgaag caagcaggag ctgaagta tctacagagc aaatcgcac 1620
 tgggaagct gcaccagaga gttgacac cagatcagc ttggtcaca tatcaatct 1680
 gacacatc atggagaaa gaagcagtc gtgtgcctc ggttgatg ttcacagag 1740
 cagmacctg tcaagacca gtcatgtg gtatgcata tgagaagac cactggggag 1800
 aagctcaca atgtacatt tgaaggttgc acaagagct artcaagac tgaacacccg 1860
 acaacacact tgagatcct cactggagag aagacatac tctgtgaga tgaaggtcgc 1920
 acaagctt tctctatg ttcagatgc gccacgacc aaacagacc acatccaat 1980
 gagaacccg atgtatgca aatccaggc tgcactagc gtacacaga cccagctct 2040
 ctccggaac agtgaagac tggcagggc ctgaggtc atgttccaa gaagcagct 2100
 ggggacatgc accctggcc tcccccctg agagattcg gcagccatc acatccag 2160
 tccctggcc ggcacacta gggagcttt gtgagcaga agagctgag caacactac 2220
 tcaaggggg aagagtgct ccagtggaag acgtcagc ctgagaagc aatgacatc 2280
 cagcaagac ctgggtgca gtcttctgc agcagccac agtccccc cagcaactat 2340
 tccacagtg ggtcagct tctctgac gaggaggtg gtatgcaga cctcagtg 2400
 atcagtaaa cccacatc ggcctgac atttccagg caacacagc cctgtctg 2460
 cagccaggc gaacccggc agggacaaa tggatggag acatcaact tgaaggtc 2520
 aacacagtg atggtgtt tccagactg aacccatc tccctccaa agccctgc 2580
 gtatctctc tctaggaag tggcacacg tccaaacaa actatgctc ggttgggccc 2640
 gggccctcc tccagagag atgtacctc tccaggtgac acttccagc gtgacaca 2700
 cccacagga gagacagca tccagacac atcagctct cctacatgag cagccgaga 2760
 tctcgggca tctccctg ctltccagc agcaggtca ggcaggtc ccagccaga 2820
 ggcagaccc agatgtgag tgtgtgac tcttcagc cctctccac agatctca 2880
 agaggttca gcagccag ccaggtgac ggttgcctc gctgtctac cctccccc 2940
 gtccagctg agcccttca ggcacagta gcagctcga caggtgccc accaccca 3000
 cctcgcctc acaggtgag cctgagctg aagacacga tggcttgc aggggaggg 3060
 agggatctg aggtgacct gctccagtc cctctctc gaagatgag tgaagggg 3120
 ggtacacat acagggggc tccctgat cctcagtg ccttgcagc cagtgtagg 3180
 agagacagc accctgtgag gacgtctc gagaatgt ccttgcagc ggttccagc 3240
 ttcagcagc tctatgct tctctcca atttgcctc cctcgttgc aagcgtgag 3300
 ttatgtcgc aaatctatc cagcagagc agcagccac cccgttact ccagcctc 3360
 cctgtctc ccagatcag agagatgt gccctggag cctgacatc ggtgtgat 3420
 gtaacttg atgtgaga cctctgca gatgtgtg tctatgtt aaatccac 3480
 aacacacag ggtatggca gcagtgag agtgatct ctgaagagc caagtagc 3540
 catgagcag agcattgga cttagcagc ctgcagaca gtcatgtg ccaggtatc 3600
 ccagctctg agcagcccg cctcagggc agtaaacct atttgcctc ccagtgga 3660
 gaggctagt ctgacctc tgatgtca tctccagc tgaagtgtg tccagcgc 3720
 cctagcagc agctcggg ttttggctc taaacata tgggttaca cccacatc 3780
 ctgtggaag ttgacatg ccagctggg ggtatcaga cctcggggc gaatagct 3840
 accacacag ggcagagca ctttgcac cccagtggt atgacttg cccacagc 3900
 aaatcttc agacagac ctttagac cagcagtg ggcagagc caacaggtc 3960
 ccactact cagctctc agatctgc tgggtacg ggttccagc gtcacagc 4020
 aagcaca ccttgcaga gaatggggg ttgtatgt tccagctgc cgttgcac 4080
 aatgagttg ctggcagc agtattgc atgcaccc aagatcaat ggcagggc 4140
 taatgcgc atcagctac agtgagc agcacaac agggccccc cagccctgt 4200
 ccacaggtc tgggcagc tgggtatc tcaatata aaatatac aggcagag 4260
 agctcctc caggtatc ggcacagc agcagcct caagctgtc agtatcag 4320
 ggtacacag cctgtgcag ctatggggg aacagggc agcagctc aggggcac 4380

119

120

ctccctctgc accagggaca gctcagtgac atgagtcaga gragcaggat gancagentic 4440
 anseicgggg cacagggica gctccagcag ctctgctctc ccgtgcagaa itaticcgg 4500
 cagictctat accaaccat gggcttcagt cagcagaca ggaagctgg ctctictctc 4560
 ctctcagatg ccaactgect gctccaggg aratgcactg aaactctga gttactctcc 4620
 ccaggigcta accaggtaac gacacagtt gacagcttg agagtcatga cctagaaggi 4680
 gtcagattg atttctgtc caictagat gatggggacc ataccagctt aatgacagg 4740
 gctttagacc caagtattat tcagacctt tccacagct cctccgtct caccactcc 4800
 cgggcacacc tccattccc aatccctatc catggggacc accaactgg ctatcggga 4860
 tatgagttct ttctgacct cctctgcaga ggaagcag ttccctgcag tttatcagta 4920
 gacgttaggc aaggaggacc aaaaacaaa agactgaat gacttgggt tttttttct 4980
 ttttaangt ctgigtgtat tttagcaatc tcaictcacc tgattgggt gtgtctcag 5040
 tttattctt ttatgggaan ggactcigan aaacctang gttctcagg gagaacctg 5100
 tttccattt cag 5113

<210> 21

<211> 1596

<212> PRT

<213> Human

<400> 21

Met Glu Ala Glu Ser His Ser Ser Thr Thr Thr Glu Lys Lys Lys Val
 1 5 10 15
 Glu Asn Ser Ile Val Lys Cys Ser Thr Arg Thr Asp Val Ser Glu Lys
 20 25 30
 Ala Val Ala Ser Ser Thr Thr Ser Asn Glu Asp Glu Ser Pro Gly Gln
 35 40 45
 Thr Tyr His Arg Glu Arg Arg Asn Ala Ile Thr Met Gln Pro Gln Asn
 50 55 60
 Val Gln Gly Leu Ser Lys Val Ser Glu Glu Pro Ser Thr Ser Ser Asp
 65 70 75 80
 Glu Arg Ala Ser Leu Ile Lys Lys Glu Ile His Gly Ser Leu Pro His
 85 90 95
 Val Ala Glu Pro Ser Val Pro Tyr Arg Gly Thr Val Phe Ala Met Asp
 100 105 110
 Pro Arg Asn Gly Tyr Met Gln Pro His Tyr His Pro Pro His Leu Phe
 115 120 125

Pro Ala Phe His Pro Pro Val Pro Ile Asp Ala Arg His His Glu Gly
 130 135 140
 Arg Tyr His Tyr Asp Pro Ser Pro Ile Pro Pro Leu His Met Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Leu Ser Ser Ser Pro Thr Tyr Pro Asp Leu Pro Phe Ile Arg Ile
 165 170 175
 Ser Pro His Arg Asn Pro Ala Ala Ala Ser Glu Ser Pro Phe Ser Pro
 180 185 190
 Pro His Pro Tyr Ile Asn Pro Tyr Met Asp Tyr Ile Arg Ser Leu His
 195 200 205
 Ser Ser Pro Ser Leu Ser Met Ile Ser Ala Thr Arg Gly Leu Ser Pro
 210 215 220
 Thr Asp Ala Pro His Ala Gly Val Ser Pro Ala Glu Tyr Tyr His Glu
 225 230 235 240

121																
Met	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Ser	Pro	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	Pro	
				245					250					255		
Ser	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Ile	His	Met	Glu	Tyr	Leu	His	
				260					265					270		
Ala	Met	Asp	Ser	Thr	Arg	Phe	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Ala	Arg	Pro	
				275					280					285		
Ser	Arg	Lys	Arg	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	
				290					295					300		
Asp	Leu	Gln	Thr	Met	Ile	Arg	Thr	Ser	Pro	Asn	Ser	Leu	Val	Thr	Ile	
				305					310					315		
Leu	Asn	Asn	Ser	Arg	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Tyr	Gly	His	
				325					330					335		
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Phe	Thr	Tyr	Ser	Ser	
				340					345					350		
Ala	Pro	Val	Ser	Leu	His	Met	His	Gln	Gln	Ile	Leu	Ser	Arg	Gln	Gln	
				355					360					365		
Ser	Leu	Gly	Ser	Ala	Phe	Gly	His	Ser	Pro	Pro	Leu	Ile	His	Pro	Ala	
				370					375					380		
Pro	Thr	Phe	Pro	Thr	Gln	Arg	Pro	Ile	Pro	Gly	Ile	Pro	Thr	Val	Leu	
				385					390					395		
Asn	Pro	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Gly	Pro	Ser	Glu	Ser	Ser	Gln	Asn	Lys	
				405					410					415		
Pro	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Val	Ser	Ser	Thr	Gly	Asp	Pro	Met	His	Asn	
				420					425					430		
Lys	Arg	Ser	Lys	Ile	Lys	Pro	Asp	Glu	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	
				435					440					445		
Arg	Gly	Gln	Gln	Gln	Gln	Pro	Glu	Gly	Thr	Thr	Leu	Val	Lys	Glu	Glu	
				450					455					460		
Gly	Asp	Lys	Asp	Glu	Ser	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	Ile	Tyr	Glu	Thr	
				465					470					475		
Asn	Cys	His	Trp	Glu	Gly	Cys	Ala	Arg	Glu	Phe	Asp	Thr	Gln	Glu	Gln	
				485					490					495		
Leu	Val	His	His	Ile	Asn	Asn	Asp	His	Ile	His	Gly	Glu	Lys	Lys	Glu	
				500					505					510		
Phe	Val	Cys	Arg	Trp	Leu	Asp	Cys	Ser	Arg	Glu	Gln	Lys	Pro	Phe	Lys	
				515					520					525		
Ala	Gln	Tyr	Met	Leu	Val	Val	His	Met	Arg	Arg	His	Thr	Gly	Glu	Lys	
				530					535					540		
Pro	His	Lys	Cys	Thr	Phe	Glu	Gly	Cys	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ser	Arg	Leu	
				545					550					555		
Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	His	Leu	Arg	Ser	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	
				565					570					575		
Val	Cys	Glu	His	Glu	Gly	Cys	Asn	Lys	Ala	Phe	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	
				580					585					590		
Arg	Ala	Lys	His	Gln	Asn	Arg	Thr	His	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Tyr	Val	
				595					600					605		
Cys	Lys	Ile	Pro	Gly	Cys	Thr	Lys	Arg	Tyr	Thr	Asp	Pro	Ser	Ser	Leu	
				610					615					62		

123															
Arg	Lys	His	Val	Lys	Thr	Val	His	Gly	Pro	Glu	Ala	His	Val	Thr	Lys
625						630				635					640
Lys	Gln	Arg	Gly	Asp	Ile	His	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Arg	Asp	Ser
				645					650					655	
Gly	Ser	His	Ser	Gln	Ser	Arg	Ser	Pro	Gly	Arg	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala
			660					665					670		
Leu	Gly	Gln	Gln	Gln	Asp	Leu	Ser	Asn	Thr	Thr	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu
			675				680					685			
Cys	Leu	Gln	Val	Lys	Thr	Val	Lys	Ala	Glu	Lys	Pro	Met	Thr	Ser	Gln
			690				695				700				
Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Ser	Cys	Ser	Ser	Gln	Gln	Ser	Pro	Ile
705					710					715					720
Ser	Asn	Tyr	Ser	Asn	Ser	Gly	Leu	Glu	Leu	Pro	Leu	Thr	Asp	Gly	Gly
					725				730					735	
Ser	Ile	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala	Ile	Asp	Glu	Thr	Pro	Ile	Met	Asp	Ser
			740					745					750		
Thr	Ile	Ser	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Ala	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Asn
			755				760					765			
Pro	Ala	Gly	Thr	Lys	Trp	Met	Glu	His	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Leu	Lys
			770				775				780				
Gln	Val	Asn	Gly	Met	Phe	Pro	Arg	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Pro	Pro	Lys
785					790					795					800
Ala	Pro	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ser	Asn	Asn
					805				810					815	
Thr	Cys	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Met	Thr	Leu	Leu	Pro	Gly	Arg	Ser	Asp
			820					825					830		
Leu	Ser	Gly	Val	Asp	Val	Thr	Met	Leu	Asn	Met	Leu	Asn	Arg	Arg	Asp
			835				840					845			
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Ala	Tyr	Leu	Ser	Ser	Arg	Arg	Ser
			850				855				860				
Ser	Gly	Ile	Ser	Pro	Cys	Phe	Ser	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Gln	Ala	Ser
865					870					875					880
Gln	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Gln	Asn	Val	Ser	Val	Ala	Asp	Ser	Tyr	Asp
					885				890					895	
Pro	Ile	Ser	Thr	Asp	Ala	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Ser
			900					905					910		
Asp	Gly	Leu	Pro	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Gln	Tyr	Arg
			915				920					925			
Leu	Lys	Ala	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Thr	Pro
			930				935				940				
Leu	Pro	Asn	Met	Glu	Arg	Met	Ser	Leu	Lys	Thr	Arg	Leu	Ala	Leu	Leu
945					950					955					960
Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Pro	Gly	Val	Ala	Leu	Pro	Pro	Val	His	Ala	Pro
					965				970				975		
Arg	Arg	Cys	Ser	Asp	Gly	Gly	Ala	His	Gly	Tyr	Gly	Arg	Arg	His	Leu
			980					985					990		
Gln	Pro	His	Asp	Ala	Leu	Gly	His	Gly	Val	Arg	Arg	Ala	Ser	Asp	Pro
			995				1000					1005			
Val	Arg	Thr	Gly	Ser	Glu	Gly	Leu	Ala	Leu	Pro	Arg	Val	Pro	Arg	Phe

125				1015				1020							
Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Cys	Asn	Pro	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	Ser	Ala	Glu
1025				1030				1035							1040
Lys	Arg	Ser	Leu	Val	Leu	Gln	Asn	Tyr	Thr	Arg	Pro	Gln	Gly	Gly	Gln
				1045				1050							1055
Ser	Arg	Asn	Phe	His	Ser	Ser	Pro	Cys	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Gln	Asn
				1060				1065							1070
Val	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Met	Asp	Ala	Asp	Ala	Asn	Leu	Asn	Asp
				1075				1080							1085
Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Val	Gln	Tyr	Leu	Asn	Ser	Gln	Asn
				1090				1095							1100
Gln	Ala	Gly	Tyr	Gln	Gln	His	Phe	Pro	Ser	Ala	Leu	Pro	Asp	Asp	Ser
1105				1110				1115							1120
Lys	Val	Pro	His	Gly	Pro	Gly	Asp	Phe	Asp	Ala	Pro	Gly	Leu	Pro	Asp
				1125				1130							1135
Ser	His	Ala	Gly	Gln	Gln	Phe	His	Ala	Leu	Gln	Gln	Pro	Cys	Pro	Gln
				1140				1145							1150
Gly	Ser	Lys	Thr	Asp	Leu	Pro	Ile	Gln	Trp	Asn	Gln	Val	Ser	Ser	Gly
				1155				1160							1165
Ser	Ala	Asp	Leu	Ser	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Arg	Pro	Ala
				1170				1175							1180
Val	Pro	Gln	Thr	Arg	Ala	Phe	Gly	Phe	Cys	Asn	Gly	Met	Val	Val	His
1185				1190				1195							1200
Pro	Gln	Asn	Pro	Leu	Arg	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Gly	Tyr	Gln	Thr	Leu
				1205				1210							1215
Gly	Gln	Asn	Ser	Asn	Pro	Tyr	Gly	Gly	Pro	Gln	His	Leu	Met	Leu	His
				1220				1225							1230
Asn	Ser	Pro	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Asn	Ala	Phe	His	Gln	Gln	Pro
				1235				1240							1245
Cys	Lys	Ala	Pro	Gln	Tyr	Gly	Asn	Cys	Leu	Asn	Arg	Gln	Pro	Val	Ala
				1250				1255							1260
Pro	Gly	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Cys	Gly	Ala	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	Lys
1265				1270				1275							1280
Leu	Lys	Ser	Thr	Pro	Met	Gln	Gly	Ser	Gly	Gly	Gln	Leu	Asn	Phe	Gly
				1285				1290							1295
Leu	Pro	Val	Ala	Pro	Asn	Gln	Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Val	Asn	Gly	Met
				1300				1305							1310
Gln	Asn	Gln	Asp	Pro	Val	Gly	Gln	Gly	Tyr	Leu	Ala	His	Gln	Leu	Leu
				1315				1320							1325
Gly	Asp	Ser	Met	Gln	His	Pro	Gly	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Gln	Gln	Met
				1330				1335							

127
 1395 1400 1405
 Leu Ser Asp Thr Ser Gln Thr Cys Arg Val Asn Gly Ile Lys Met Glu
 1410 1415 1420
 Met Lys Gly Gln Pro His Pro Leu Cys Ser Asn Leu Gln Asn Tyr Ser
 1425 1430 1435 1440
 Gly Gln Phe Tyr Asp Gln Thr Val Gly Phe Ser Gln Gln Asp Thr Lys
 1445 1450 1455
 Ala Gly Ser Phe Ser Ile Ser Asp Ala Ser Cys Leu Leu Gln Gly Thr
 1460 1465 1470
 Ser Ala Lys Asn Ser Gln Leu Leu Ser Pro Gly Ala Asn Gln Val Thr
 1475 1480 1485
 Ser Thr Val Asp Ser Leu Asp Ser His Asp Leu Gln Gly Val Gln Ile
 1490 1495 1500
 Asp Phe Asp Ala Ile Ile Asp Asp Gly Asp His Ser Ser Leu Met Ser
 1505 1510 1515 1520

Gly Ala Leu Ser Pro Ser Ile Ile Gln Asn Leu Ser His Ser Ser Ser
 1525 1530 1535
 Arg Leu Thr Thr Pro Arg Ala Ser Leu Pro Phe Pro Val Ala Val His
 1540 1545 1550
 Glu His His Gln His Gly Tyr Arg Gly His Gln Phe Phe Ala Asp Leu
 1555 1560 1565
 Pro Ser Gly Arg Lys Gln Ile Pro Cys Ser Tyr Ala Ile Gly Phe Arg
 1570 1575 1580
 Lys Lys Arg Leu Gln Pro Thr Glu Ile Asn Arg Ser
 1585 1590 1595

<210> 22

<211> 5055

<212> DNA

<213> Human

<400> 22

cgtactacg tgggcattt tggcgnaga ggcgtgaagt aatgagaaga catcctggag 60
 ggcagctccc acagctccac gaacacigaa angaannaaq tggagaatic catagtgaag 120
 tgcctacac gaacagaigt gagcgagaaa ggcgttgert ccagacacac ttctaatgag 180
 gctgaangtc ctggacagac ttaacacaga gagagaagaa argcaaiac tatgcagcca 240
 cagaatgtcc aggggtccag caaatgtcgt gaggaaacct caaatcagag tgaagagagg 300
 gctcatiga tcaagaaaga gatcaagggt tccctgcac acgtggcggt ggcctctggt 360
 ccgtacgcgc ggaaggigt tgcctggac cccaggaatg gtlacatgga ggcacaciac 420
 caacctctc atctttccn tgccttcac cctcctgtac caatgaigc cagacatcat 480
 gagggcgtt acattacga tccatctcc attctcnci tgcattgac ttcgcctta 540
 tcactagac ctacgtatcc ggaactgcc ttcatlaga tctctcaca ccggaacctc 600
 gctgtgtt cagatctcc ctccagccci ccacatccct acattatca ctactggac 660
 tatacgcct cctgacag cagcccatcg ctctcagaa tctcagaaa ccgtgggtgt 720
 agccctacag atgggcccc tgcagggtc agccagcag aaactatca ttagatggcc 780
 ctgctatctg gccagcag cccctagca gacattatc cctcagctgc caccgctggc 840
 accggagcca tccatigga atacticat gctatggata gcaccagatt ctccagccc 900
 aggtatcag ccaggccag ccgannacgt acactgtcca tctaccact ctccgacat 960
 agcttgacc ttcagccat gataggag tctccacai ccttggtac gattctcnaat 1020
 aattccgta gtagctctc agcaagtggc tctatggtc actiatctgc aagtgcactc 1080
 agactgert tgagctctc ctactctcc ggcctgtct ctctcccat gctacagag 1140

129

130

atcetaagcc gacaacagag attaggttca gccittggac aagaccctcc actcatccac 1290
 cctgcaccca ctttccacc aagaggccci attccaggga tccctacggt tetgacccc 1260
 gtccaggta gccccggccc ttctaggtcc tccagagacn agccacagag tgagictgca 1320
 gtgagragca ctggtagccr galgacacac aagaggctcc agatcaaac ccagtagaac 1380
 ctcccragcc caggggctcg gggccagcag gaccagccc aaggaacac ccttgtccag 1440
 gaggagggg acaagatga agcnaacag gacctgaag tcatctatga gacaaactgc 1500
 cactgggaag gctgcgcag gaggttcgac acccaagagc agcttgtgca ccatataaat 1560
 aacgcccata ttctggaga gaagaaggag ttctgttgca ggtggtgga cgttcaaga 1620
 gaggagaaac cctcaagc ccagiatatg ttgtgtgtgc atatgagag acacccgggc 1680
 gaggagccic acaatagac tttagaggt tgcacaaag cctactcgag actagaaac 1740
 ttgaanaac acttagagac tccactgga gagaacccat acgtcigtga gacagaggt 1800
 tgcacaaag ctttccaaa tgcctcigt cgcgcacac acccaaaag aacgcttc 1860
 aatgagaaac cctatgtga caaatccn ggcgcacta agcttacc acacnaagc 1920
 tccctcggga aacatgtga gacgtgcat ggcacagag cctatgtac naagagcag 1980
 cagagggaca tccatctcg gccccaccc ccagagatc cggcagcca ttccagtc 2040
 aggtgcctg gccgaccgac tccggagcc cttgttagc agcaggaact cagcaacac 2100
 acctaaagc gggagagat cctccagggt aaacctgca aggcagagaa gccaaigac 2160
 tctcagccaa gccctgttg tccgtttca tgcagcagcc aacagtcac catcagrac 2220
 tatccacaa ggggtctga gcttctcag accgatggag gtatgtagc agacccagt 2280
 ggcacagtg aaccccaat caggactca acctttcc ctcacacac agccctgt 2340
 ttgcagcca ggaanaacn ggcagggac aaatggatg agcaggtata actagaaag 2400
 ctaaacaaag tgaatggat gttccggga ctgaaccca ttccacccc taagccct 2460
 ggggtctct cttccatag aaatggcaca cagtcacac aacactgag cttgggtgg 2520
 cccatgaagc ttctccggc cagaagcgac ctctatggg tggagtcac tatcagac 2580
 atgtcaaca gaggggacg cggccacag accatagct cggctact cagcagcgc 2640
 cgtctctcg ggtctcgc ctgcttcc agcccgcc cagagagagc gtcacagcc 2700
 gaggccggc cgcagacgt ggcgtgccc gactccacg acccatct caacagcc 2760
 tccgcccgt cagcgaagc cagccagagc gaggccctg ccagctgt cagccacg 2820
 cccgcccagc agtacccgt caaggccag tccgggtg ccacagagc gccgcccgc 2880
 accgcccgt ccaacagga gagaagagc ctgaagagc gcctggcc cctggggat 2940
 gccctagag cttgctggc cttgcccca gttcatgccc cagagaggt cagggaggg 3000
 gtagccacg gctacggcg ggcacactg cggccgacg atgctgtgg ccacggctg 3060
 agggggcca ggaacgggt gggacagcc tccagggcc tggccctgc ttgtgtgc 3120
 cgttcagca gctcagcag ctgcacccc cggcgatg ccacgtctgc ggaagagcc 3180
 agtctctgc ttccagata cccgggccc gaggcgccc agtcccgaa cttccactg 3240
 tccctctgc ctcacagcat cccagagac gtcacctg agtccctgac cctgagct 3300
 gctgcaacn tgaacatga ggtttctc cccgagcag tggtagta tttaattcc 3360
 cagaacacg cagggtacg ggcacactc cccagccccc tccggagca cagaaagt 3420
 cccacgggc cgggtgact tgcagccgc gggctgcag acccaacgc tggcagcag 3480
 ttccatgcc tccagagcc cttcccccag ggcagaaaa ccgacctgc ccttctgg 3540
 aaggaagta gctcaggag cccagactg tccctctca agctcagtg tggccgcg 3600
 ctgctgtgc cgcagctcg cgttttgg ttctgcaag gcatgtgt ccccccag 3660
 aacccctga ggaagggcc tctgggggc tctcagacc tggggagaa cagcaaccc 3720
 tctggggcc cagagccat gctgtccc accagcccc gaagtggac cagtggaac 3780
 gccctccatg aacagccgt taaggcccc cagtatggg actgtctaa cagcagcca 3840
 gtggccctg gtcactga cgggtcctg ggtgcgggc ttcaagctc aagcctgag 3900
 agcaaccca tgcagggag cgggggccc ctgaattcg gctgcgggt agcccaaat 3960
 ggtctctgc gacagctgt gattggcat cagacccag acccagtgg acaggggac 4020
 ctggctacc agtctctg cagagcatg cagcaccgc gggcagccc ccccggtcag 4080
 cagatgctg ggcagctag tctactca ccaatcaac tcaacagg ggcagagag 4140

「場所の格別な説明」

* 別添示す図である。

【図1】一文字変異によるマウスG111のアミノ酸配列

1000
 1000
 1000
 1000

[illegible]

フットボールの歴史

(54) Int. Cl.	識別記号	F I	7-7-7 (参考)
A 6 1 P 19/00		A 6 1 P 19/02	4 C 0 8 6
19/02		19/08	4 H 0 4 5
19/08		19/10	
19/10		43/00	1 0 5
43/00	1 0 5	C 1 2 Q 1/02	
		1/68	A
C 1 2 N 5/06		G 0 1 N 33/15	Z
15/09	Z N A	33/50	Z
C 1 2 Q 1/02		33/53	D
1/68			M
G 0 1 N 33/15			
33/50		33/566	

33/53	C 0 7 K	14/47	
	A 6 1 K	37/02	
33/565	C 1 2 N	15/00	Z N A A
// C 0 7 K		5/00	E

F ターム(参考) 2C045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36
FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09
CA20 DA02 DA03 EA04 FA02
FA06 GA13 GA18 HA11 HA14
HA17

4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19
QQ08 QQ21 QQ41 QQ43 QQ53
QQ61 QQ69 QR08 QR32 QR35
QR40 QR42 QR56 QR62 QR77
QR80 QS16 QS25 QS34 QX02

4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y
AB01 AC14 AC20 BA02 CA24
CA43 CA44 CA46

4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA02
BA22 CA17 NA14 ZA96 ZA97
ZB21

4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14
ZA96 ZA97 ZB21

4B045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA20
EA50 FA74